

최 중
연구보고서

진도개 동결정액제조와 자궁내
인공수정기술개발

Development of Frozen Semen Making
and Intrauterine Inseminator in Jindo-Dog

순 천 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “진도개 동결정액제조와 자궁내 인공수정기술개발”과제의 최종
보고서로 제출합니다.

2003년 8월 13일

주관연구기관명 : 순천대학교
총괄연구책임자 : 공 일 근
세부연구책임자 : 공 일 근
협동연구기관명 : 가축개량사업소
협동연구책임자 : 김 홍 룰
협동연구기관명 : 진 도 군청
협동연구책임자 : 윤 창 호

요 약 문

I. 제 목

진도개 동결정액제조와 자궁내 인공수정기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

천연기념물 53호이며 국제공인(FCI) 334호(1995)로 지정 받은 진도개의 혈통보존과 국제적인 명견으로 육성하기 위해서는 유전자원과 정액보존 및 이를 이용한 인공수정기술의 확립이 절실히 요구된다. 동결정액을 이용한 인공수정의 많은 장점들이 대가축에서 이미 증명되어 산업화되었다. 그러나 개의 동결정액제조와 인공수정기술은 정립되어 있지 않을뿐더러 진도개의 유전자원보존은 더더욱 미흡한 실정이다. 또한 세계적으로 자궁내 인공수정기술이 완벽하게 정립되어 있지 못하여 우수한 종견들의 이용효율의 향상에 한계점이 있다. 그리하여 자궁내 인공수정기술정립과 인공수정기구를 개발하여 진도개의 유전자원보존과 정자은행운영, 동결정액제조기술정립 및 자궁내 인공수정기구의 제품화와 세계화가 가능할 것이다. 또한 이러한 기술을 다른 소형애완견 또는 대형특수견 등에도 적용 가능하여 그 효율적인 측면에서 대단히 가치가 있어 본 연구과제의 필요성이 강하게 대두되고 있다.

개는 정액채취시 1회사정당 총정자수가 약 3-5억정도로서 타 동물에 비하여 총정자수가 매우 적기 때문에 그 이용효율을 향상시키지 않는다면 품종개량과 이용효율에서 한계점이 될 수 있다. 질내 주입방법에 의한 인공수정시 1회 채취하여 1마리에게 주입하게 되므로 이는 비효율적으로 판단되어 동결정액제조방법정립과 자궁내 인공수정방법의 개발이 요구된다. 왜냐하면 동결정액을 질내보다 자궁내에 주입함으로써 정자수명을 연장시켜 수정능력을 향상시킴과 동시에 총정자수를 약 1/5-1/10까지 줄여 정액이용효율을 5-10배정도 향상시킬 수 있기 때문이다.

외국으로부터 우수 종견 및 애완견의 수입으로 '99. 10 누계(수의과학검역정보, 1999)에 의하면 1,451건(2,131두)으로서 상당한 외화반출이 일어나고 있으며, 이들 중

견을 이용한 자연종부시 고가의 종부료(20만원-1백만원)를 형성하고 있다. 또한 '99년 현재 약 800만명 정도가 애완견을 사육하고 있는 것으로 조사되고 있어 애완견 및 진도개의 사육이 보편화되고 있는 현실이다. 진도군내에 진돗개사육두수는 1999. 12 현재 4,794농가에서 10,627두수(♂: 2,075, ♀: 8,552)가 사육되고 있다. 이같은 현실을 직시할 때 직접적인 종견수입을 동결정액수입으로 대체할 수 있다면 연간 약 1,000억 이상의 외화절약효과가 있을 것이고, 동결정액을 이용한 인공수정을 실시한다면 종부비용을 절반이하로 낮출 수 있어 애완견사육인구의 증가와 주변산업의 활성화 등을 도모하여 경제적인 가치는 매우 크다고 판단된다.

21C에는 유전자원의 전쟁이라고 표현하듯이 우리고유의 유전자원보존이 요구된다. 진도개의 우수성을 홍보하고 세계의 명견으로 발전시키기 위하여 체계적인 유전자원 보존과 계획적인 번식육종 및 인공수정 등 관련분야연구의 산업화가 이루어져야 할 것이다. 경제성장과 더불어 애완견의 사육인구의 증가는 필연적이며, 이러한 추세를 고려한다면 관련분야의 지속적인 발전은 필연적인 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

진도개의 고장인 진도군의 진도개 사육현황을 파악하고 그들 중에서 우수혈통을 보존하고 있는 진도개를 선발하여 이를 이용한 동결정액의 제조와 자궁내 인공수정기법으로 우수한 진도개의 대량번식기반을 조성하고 또한 유전자원의 장기보존과 동결정액을 이용한 계획적인 육종번식을 꾀할 수 있는 기반을 조성하고자 한다. 이를 위하여 요구되는 사항은 동결정액의 제조기법의 정립, 적정 희석액의 조성, 자궁내 인공수정기구의 개발 및 자궁내 인공수정기법의 정립 등이다. 자궁내 인공수정기구의 개발은 우수종견의 효율적인 이용이 가능할 뿐만 아니라 이를 제품화하여 전세계를 상대로 무역이 가능하다고 판단된다. 또한 우수혈통의 종견을 이용한 정자은행을 운영한다면 국내뿐만 아니라 전세계를 상대로 동결정액의 무역이 가능하리라 판단된다.

제 1세부과제: 동결정액을 이용한 인공수정기술의 개발

- 자궁내 인공수정기구의 개발

- 자궁내 인공수정기구 시제품의 개선보완조치
- 동결정액을 이용한 인공수정기술의 정립
- 자궁내 인공수정기구와 인공수정기술의 보급

제 2세부과제: 동결정액희석액 및 제조기술 개발

- 진도개 동결정액 제조를 위한 기초기술정립
- 진도개 동결정액 제조 및 적정충진 정자수 정립
- 진도개의 개체간 동결능력의 조사
- 우수한 진도개의 정자은행 구축

제 3세부과제: 진도개관리 및 농가인공수정

- 시험용 진도개의 선발관리
- 인공수정적기 판단기준 정립 및 시범적 농가인공수정 실시
- 자궁내 인공수정기술을 이용한 체계적인 번식육종 실시

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

진도개 동결정액제조와 자궁내 인공수정기술의 개발은 성공적으로 이루어졌다고 판단된다. 동결정액제조는 소 동결정액의 활력도와 유사한 성적을 얻어 기술적인 정립과 산업화에 문제가 없는 것으로 판단된다. 현재까지 세계적으로 1회 인공수정시 약 5천만의 정자수를 주입하였으나, 2천5백만의 정자수 주입으로도 수태성적에 별 차이가 없어 정자의 이용효율의 2배 향상시켰다. 자궁내 인공수정기술개발을 위해 자궁내 인공수정기구를 독창적으로 개발함과 동시에 이를 이용한 자궁내 인공수정기술을 정립하여 가축인공수정사와 수의사들에게 기술이전을 실시하여 이전 개의 자궁내 인공수정이 불가능한 것이 아니라 가능한 것으로 인식전환이 이루어져 있다. 개의 인공수정 시 수정적기의 정확한 판단은 매우 중요한 요인인데 수정적기 판단을 위하여 초음파의 이용으로 난소에 존재하는 난포의 발육정도를 기준으로 수정적기를 판단하여 기술을 정립하여 수태율 향상에 매우 큰 영향을 미쳤다고 판단된다.

이렇게 개발된 동결정액제조, 수정적기판단기술 및 자궁내 인공수정기술을 가축인 고수정사, 수의사등에게 기술보급을 확대실시하여 소 인공수정뿐만 아니라 새로운 분야인 개 인공수정으로의 진출을 도모함으로써 새로운 산업으로의 정착이 가능할 것이다. 또한 진도개 뿐만 아니라 애완견으로의 새로운 기술접목 및 개발이 요구된다고 판단된다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title of the Study

Development of Frozen Semen Making and Intrauterine Insemination
Technique in Jin-do Dog

II. Purpose and Necessity of the Study

Establishment of frozen semen making and intrauterine insemination technique are really required to preserve the genetic materials and develop superior dog, Jindo-Dog, of which designated already 53th of natural mounment in Korea and 334th in FCI at 1995. The merits of artificial insemination with frozen semen in domestic animal has been approved and commercial application. However, the frozen semen and intrauterine insemination technology in dog did not established yet and insufficient of preservation of genetic materials in Jin-do dog. There was a limitation in useful improvement of superior dog, because an establishment of intrauterine insemination technology was not perfectly developed yet. And so the development of intrauterine insemination technique and intrauterine inseminator could be applied with preservation of genetic materials, semen banking, making of frozen semen and marketing of intrauterine inseminator in the world. These technology can apply for smaller and larger pet dog, and so need to study this project strongly.

If the utilization of dog semen could not improved, the development of dog breeding have limited from too low total semen number per collection, 300 to 500 million sperms. Intra vaginal insemination technique is inefficiency, because of one insemination per collection. So an intrauterine insemination technique need to

develop for improving of semen utilization. If we can inseminate into uterus, not vagina, the efficiency of semen utilization could be increased 5 to 10 times rather than intra vagina insemination.

A lot of dollars for import of superior dog from oversea had been expended and so need to paid too high price for mating with them. There are rear the pet dog and Jin-do dog in Korea approximately 8 million. The rear of Jin-do dog in Jin-do island was reported about 10,627 dog (♂: 2,075, ♀: 8,552) in 4,794 farm at 1999. December. If we can import a frozen semen instead of alive dog, we can drop the expended dollars about 100 billions per year and decrease of mating pay to more the half price, and then increase the population of pet dog rearer and activation of related industry.

We need to preserve our genetic materials such as Jindo-dog. The preservation of genetic materials sysmetically and reproductive breeding such as artificial insemination have to develop of Jin-do dog for superior one in the world. The population of pet animal rearer must be increase and so need to develop of related industry, especially reproductive technology.

III. Scope of the Study

The superior Jin-do dog at Jin-do island must be select to preserve of superior one by frozen semen, intrauterine insemination technique, and so establish the basement of multi-reproduction system and preservation of genetic materials. To do this, we have to settlement of cryopreservation system of semen, optimal extender buffer system, intrauterine insmeinator, intrauterine insemination technique and so on. The development of intrauterine inseminator could be possible of using of superior dog semen as well as marketing of them in the world. The semen banking of superior Jin-do dog could be traded in the domestic and world marketing.

1. Development of intrauterine insemination technique with frozen semen
 - Development of intrauterine inseminator
 - Improvement and repletion of intrauterine inseminator
 - Settlement of intrauterine insemination technique with frozen semen
 - Propagation of intrauterine inseminator and intrauterine insemination technique

2. Development of extender buffer and making technique
 - Establishment of basic technique for making of frozen semen in Jin-do dog
 - Establishment of frozen semen making and optimal semen concentration
 - Survey of frozen potential from individual dog
 - Establishment of semen bank of superior Jin-do dog

3. Management of Jin-do dog and artificial insemination in farm
 - Selection and management of Jin-do dog for experiment
 - Establishment of optimal insemination point and artificial insemination in farm
 - Reproduction and breeding using intrauterine insemination technique

IV. Result of the Study

We judged the successful of development of frozen semen making and intrauterine insemination technique with intrauterine inseminator. The viability of frozen semen in Jin-do dog is similar with bovine one and establishment of frozen semen making technique, and so no problem for applying of industry. There was need approximately 50 million sperm concentration per insemination for intrauterine insemination in this study. An intrauterine inseminator had been developed by myself and establish of intrauterine insemination technique, of which was spreaded to an artificial inseminator and veterinary for using insemination. The judgement of optimal insemination point is very important to improve of pregnancy rate and

so develop this technique by ultrasonography, of which can be detect of follicle size in the estrus ovary.

If we can spread this technique to artificial inseminator and veterinary, who can apply to new field, in dog AI such as cow AI. This technology can be also apply to pet industry as well as Jin-do dog.

CONTENTS

(영 문 목 차)

SUMMARY(Korean).....	2
SUMMARY(English).....	6
CONTENTS.....	10
Chapter 1. Introduction.....	14
1. Needness for technical field.....	14
2. Needness for industrial field.....	14
3. Needness for cultural field.....	15
Chapter 2. International Technical Status.....	16
1. Oversea status.....	16
2. Domestic status.....	18
3. Weakness of present technical status.....	19
Chapter 3. Experiment Scope and Results.....	20
Section 1. Experiment scope.....	20
1. Selection and management of experimental dog.....	20
2. Semen collection and test.....	20
3. Short time preservation test of diluted semen.....	21
4. Making of frozen semen.....	22
5. Thawing and test of post-thaw semen.....	22
6. Analysis of extender of frozen semen.....	22
7. Development of intrauterine inseminator.....	23
8. Establishment of optimal AI point detection.....	23
Section 2. Experiment results.....	24
1. Development of intrauterine inseminator.....	24

목 차

요약문	2
영문요약문	6
영문목차	10
제 1장 연구개발과제의 개요	14
1. 기술적 측면에서의 필요성	14
2. 경제·산업적 측면에서의 필요성	14
3. 사회·문화적 측면에서의 필요성	15
제 2장 국내외 기술개발 현황	16
1. 국외의 경우	16
2. 국내의 경우	18
3. 현 기술상태의 취약성	19
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	20
제 1절 연구수행 방법	20
1. 공시동물의 선발과 관리	20
2. 정액채취와 원정액검사	20
3. 희석정액의 단기보존검사	21
4. 동결정액의 제조	22
5. 동결정액의 용해와 생존율 조사	22
6. 동결정액 희석액의 조성성분 조사	22
7. 자궁내 인공수정기구의 개발	23
8. 인공수정 적기 판정을 위한 기술 정립	23
제 2절 연구수행 결과	24
1. 자궁내 인공수정기구의 개발	24
2. 동결정액을 이용한 인공수정기술의 정립	27

3. 진도개 동결정액제조를 위한 기초기술 정립.....	33
4. 진도개 동결정액제조 및 적정 충전정자수 정립.....	38
5. 시험용 진도개의 선발관리.....	52
6. 인공수정적기판단기준 정립 및 시범적 농가 인공수정 실시.....	53
7. 최적의 인공수정적기 판단계법 정립.....	55
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	67
1. 년도별 연구목표.....	67
2. 평가 착안점 및 달성도.....	69
3. 관련분야에의 기여도.....	70
제 5장 연구개발결과의 활용계획.....	71
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	72
제 7장 참고문헌.....	73

제 1 장 연구개발과제의 개요

천연기념물 53호이며 국제공인(FCI) 334호(1995)로 지정 받은 진도개의 혈통보존과 국제적인 명견으로 육성하기 위해서는 유전자원과 정액보존 및 이를 이용한 인공수정기술의 확립이 절실히 요구된다. 동결정액을 이용한 인공수정의 많은 장점들이 대가축에서 이미 증명되어 산업화되었다. 그러나 개의 동결정액제조와 인공수정기술은 정립되어 있지 않을뿐더러 진도개의 유전자원보존은 더더욱 미흡한 실정이다. 또한 세계적으로 자궁내 인공수정기술이 완벽하게 정립되어 있지 못하여 우수한 종견들의 이용효율의 향상에 한계점이 있다. 그리하여 자궁내 인공수정기술정립과 인공수정기구를 개발하여 진도개의 유전자원보존과 정자은행운영, 동결정액제조기술정립 및 자궁내 인공수정기구의 제품화와 세계화가 가능할 것이다. 또한 이러한 기술을 다른 소형애완견 또는 대형특수견 등에도 적용 가능하여 그 효율적인 측면에서 대단히 가치가 있어 본 연구과제의 필요성이 강하게 대두되고 있다.

1. 기술적 측면에서의 필요성

개는 정액채취시 1회사정당 정자수가 약 3-5억정도로서 타 동물에 비하여 총정자수가 매우 적기 때문에 그 이용효율을 향상시키지 않는다면 품종개량과 이용효율에서 한계점이 될 수 있다. 질내 주입방법에 의한 인공수정시 1회 채취하여 1마리에게 주입하게 되므로 이는 비효율적으로 판단되어 동결정액제조방법정립과 자궁내 인공수정방법의 개발이 요구된다. 왜냐하면 동결정액을 질내보다 자궁내에 주입함으로써 정자수명을 연장시켜 수정능력을 향상시킴과 동시에 총정자수를 약 1/5-1/10까지 줄여 정액이용효율을 5-10배정도 향상시킬 수 있기 때문이다.

2. 경제·산업적 측면에서의 필요성

외국으로부터 우수 종견 및 애완견의 수입으로 '99. 10 누계(수의과학검역정보, 1999)에 의하면 1,451건(2,131두)으로서 상당한 외화반출이 일어나고 있으며, 이들 종견을 이용한 자연종부시 고가의 종부료(20만원-1백만원)를 형성하고 있다. 또한 '99년 현재 약 800만명 정도가 애완견을 사육하고 있는 것으로 조사되고 있어 애완견 및 진도개의 사육이 보편화되고 있는 현실이다. 진도군내에 진돗개사육두수는 1999. 12 현

재 4,794농가에서 10,627두수(♂: 2,075, ♀: 8,552)가 사육되고 있다. 이같은 현실을 직시할 때 직접적인 종건수입을 동결정액수입으로 대체할 수 있다면 연간 약 1,000억 이상의 외화절약효과가 있을 것이고, 동결정액을 이용한 인공수정을 실시한다면 종부비용을 절반이하로 낮출 수 있어 애완견사육인구의 증가와 주변산업의 활성화 등을 도모하여 경제적인 가치는 매우 크다고 판단된다.

3. 사회·문화적 측면에서의 필요성

21C에는 유전자원의 전쟁이라고 표현하듯이 우리고유의 유전자원보존이 요구된다. 진도개의 우수성을 홍보하고 세계의 명견으로 발전시키기 위하여 체계적인 유전자원보존과 계획적인 번식육종 및 인공수정 등 관련분야연구의 산업화가 이루어져야 할 것이다. 경제성장과 더불어 애완견의 사육인구의 증가는 필연적이며, 이러한 추세를 고려한다면 관련분야의 지속적인 발전은 필연적인 것이다.

제 2장 국내외 기술개발 현황

1. 국외의 경우

가. 동결정액

* Ivanova-Kicheva 등(1995)은 용해방법이 개 동결정액의 형태와 기능적 상태에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 희석액으로 Tris-fructose, Tris-glucose 및 Sucrose-lactose buffer를 이용하여 37℃에서 8초간 또는 55℃에서 5초간 각각 용해한 결과 Sucrose-lactose buffer에서 55℃ 5초간 용해한 처리구에서 가장 높은 활력도를 얻었다.

* Rota 등(1997)은 개 동결정액제조시 희석액에 0.5% Equex STM paste를 Tris-citrate -glucose extender에 첨가하여 61.4% 생존율과 용해후 3시간째까지 35.4%로 이를 첨가하지 않은 56.4 및 7.1%의 생존율보다 높은 생존율을 얻었다. 또한 이의 첨가군에서 원형질막, 침체 등에 유의적인 영향을 미쳐 희석액에 이의 첨가가 매우 효과적이라는 결론을 얻었다.

* Strom 등(1997)은 희석액, 희석단계, 평형시간 및 동결용해속도의 방법이 다른 Anderson과 CLONE 방법으로 정액을 동결·용해후 실온에서 활력도를 조사한 결과 용해직전 활력도(70 vs 75.3%), 6시간째(40.3 vs 28.7%)와 37℃에서 용해직전(69.7 vs 73.7%)과 3시간째(22.4 vs 2.5%)와 같이 용해후 시간이 경과할수록 Anderson방법에서 더 높은 활력도를 보였다.

나. 인공수정

* Fougner 등(1973)은 청여우 동결정액을 인공수정시켜 자궁내 인공수정의 연구에 많은 공헌을 하였다. 이때 plastic speculum과 metal catheter로 구성된 간단한 기구를 사용하였다.

* Farstad(1984)는 신선정액과 동결정액의 인공수정 및 자연교미후 수정능력을 조사하여 자연교미(92%), 신선정액을 자궁체에 주입(84%)의 출산율을 얻었다. 동결정액을 자궁내 인공수정(67%)이 신선정액 질내주입(25%)보다 높은 성적을 보고하였다.

* Farstad와 Anderson Berg(1989)은 인공수정적기관정을 위하여 질세포의 세포학적

변화와 혈장 progesterone 농도 및 질상피세포의 관찰 등의 판단방법을 제시하였다. 질상피세포의 각질화가 80-90%까지 진행되었을 때와 혈중 progesterone의 농도가 10 ng/ml 이상일 때 수정적기로 판단하는 방법이 가장 일반적으로 이용되고 있다.

* Concannon과 Battista(1989)는 내시경과 catheter를 이용하는 인공수정기법을 소개하였다.

* Wilson(1993)은 내시경과 catheter를 이용하여 개에서 83%의 수태율을 보고하였다.

* Farstad 등(1992)은 Silver fox동결정액을 자궁내 인공수정시 Foca sheath, Foca pistol 및 Inserting tube 등의 인공수정기구로 자궁내 정액주입하였다. 이때 최소 3,700만 정자수를 주입하여 68% 수태율과 6.4마리의 산자수를 얻어 정자수를 낮출 수 있는 자료를 제시하였다.

* Silva와 Verstegen(1995)은 3종류 buffer, 즉 laiciphos group, Tes/Tris 및 biociphos group으로 동결한 동결정액을 자궁내 인공수정을 비교하였다. 동결정액의 동결전·후의 활력도는 95/65, 95/65 및 95/50%로서 유의차는 없었으나 질적인 면에서는 biociphos group이 가장 좋지 않은 결과를 얻었다.

* Rota 등(1999)은 Tris-buffer에 Equex STM paste의 첨가 또는 무첨가 희석액에서 동결한 동결정액을 자궁내 또는 질내 정액주입에 따른 수정율을 조사한 결과 첨가구(69%)와 무첨가구(58%)의 활력도를 보였다. 수정율에는 자궁내 주입구(100%)와 질내 주입구(80%)의 성적을 보였고, 복당 강아지생산은 5마리로 유의적인 차이가 없었다.

* Linde-Forsberg 등(1999)은 질내/자궁내 인공수정의 13년간(1983-1995) 현장자료를 비교한 결과를 보고하였다. 동결정액을 이용한 141마리의 질내 인공수정에서 발정주기당 AI의 횟수, 즉 1, 2, 3, 4 및 5회에 걸쳐 실시한 결과 분만율(34.8, 60.0, 63.9, 70.6 및 80.0%)은 인공수정횟수가 증가할수록 높아지는 경향을 보였다. 동결정액을 이용한 167마리의 자궁내 인공수정시 발정주기당 인공수정횟수, 즉 1, 2 및 3회당 84.3, 82.8 및 91.3%의 분만율을 보여 유의차가 없었다. 인공수정시 정자수에 따른 분만율에서는 질내인공수정과 자궁내인공수정법에 따라 1억이하(28.6 vs 100%), 1-2억(45.8 vs 90.3%), 2-3억(50.0 vs 77.4%) 및 3-4억(63.2 vs 76.2%)로 1억이하에서 질내주입에 의한 인공수정시 유의적으로 낮은 분만율을 보였다.

2. 국내의 경우

* 김 등(1994)은 methanol을 이용한 정액동결시 용해후 양호한 활력과 생존율을 얻은 정액처리조건에 관하여 보고하였다. 이때 -60 또는 -80°C 가 사용될 수 있으며, 개 정액동결시 glycerol, egg yolk, Tris와 같은 구성성분들이 모두 필요하며 특히 glycerol과 Tris가 필요하다는 사실을 확인하였다. 또한 methanol 이용 동결시 동결후 동결보존기간이 진행될수록 정자활력 및 생존율이 감소된다는 사실을 보고하였다.

* 김과 김(1995)은 methanol을 이용한 동결방법으로 동결정액을 제조하는데 성공하였다. 정액채취시 개체간에 차이는 있었지만 $2.2-7.6 \times 10^8$ sperm/ml의 농도의 정액의 채취하였고 이들의 활력도는 80-95%의 성적이었다. 동결용해후 약 70%정도의 생존율과 5-10% glycerol구에서 77%와 55%의 생존율과 활력도를 얻어 DMSO구보다 유의적으로 높은 성적을 얻었다.

* 신 등(1997)은 내시경을 이용한 동결정액의 인공수정으로 산자생산에 성공하였다. 인공수정시기는 혈중 progesterone 농도검사결과에 의해 5 ng/ml 이상인 때로 판단하였고, LH surge후 4일째와 6일째에 해당하는 날에 각각 실시하였다. 정액량은 인공수정 1회당 1.5 ml(정자수 1.5억)였으며, 용해된 정자활력은 70%이상, 생존율은 65%였다. 인공수정일로부터 61일째에 암컷 1두를 분만하여 개에서 내시경을 이용한 동결정액을 인공수정하여 산자를 생산하였다.

* 김 등(1999)은 정액의 단기보존과 동결보존후 생존성에 관한 연구에서 원정액과 정장제거 정액을 4°C , 20°C 및 37°C 에서 보존했을 때 보존시간별 정자활력은 20°C 의 경우 1, 6, 13, 24, 30 및 40시간(98.5, 98.3, 86.3, 92.1, 83.7 및 89.2%)으로서 4°C 와 37°C 에 비해 높은 정자운동성을 나타냈다. 제2분획정액과 정장제거정액을 제1차와 2차희석액으로 희석 평형시킨후 동결·용해했을 때 정자생존율은 각 33.3, 54.7%로서 대조군의 15.4%에 비해 높게 나타났다.

* 공 등(1999)은 Tris-egg yolk-glycerol완충액으로 Japanese Spitz의 정액으로 동결보존한 결과 용해후 60% 생존율과 4마리의 자궁내 인공수정후 3마리에서 11마리의 강아지를 생산하였다. 자궁내 인공수정기구의 새로운 모델을 제시해 간편하면서도 효과적인 자궁내 인공수정기구를 제안하였다.

3. 현기술상태의 취약성

현재까지 개발되어 있는 동결정액희석액의 조성으로 용해후 약 60%전후의 활력도를 얻을 수 있다. 이는 소 동결정액제조시 약 80%이상의 생존율을 얻을 수 있는 것과는 상당히 낮은 생존율을 보이고 있는 것이다. 축종간에 특성도 크게 관여하겠지만 개에 적합한 희석액조성의 연구가 더 필요한 것으로 판단된다. 개의 인공수정시 일반적으로 1회 인공수정시 약 1억전후의 농도로 주입하고 있으나, 이는 1회 채취시 3-5억정도의 농도와 약 60% 전후의 생존율을 감안한다면 1회 채취하여 1두에 인공수정시키는 비경제적이고 비효율적인 측면이 높다. 또한 질내 인공수정시에는 정자의 생존기간이 짧아 수태율이 낮은 문제점도 아울러 지니고있어 자궁내 정액주입방법, 즉 편리한 자궁내 인공수정기법의 개발이 절실히 요구되는 것이다. 이러한 문제점을 종합적으로 해결하기 위해서는 우선 개에 적합한 동결정액희석액의 조성, 동결·용해후 생존율과 활력도의 향상, 자궁내 인공수정기법의 개발 및 인공수정기구의 개발이 요구된다. 최소한의 정액농도로 자궁내 인공수정시켜 산자수의 감소없이 수태율을 향상시킬 수 있다면 우수한 종견들의 효율적인 이용과 경제적인, 즉 상업적인 접근도 충분히 가능하다고 판단된다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구수행 방법

1. 공시동물의 선발과 관리

정액채취와 동결정액제조 및 인공수정기술의 정립을 위해 공시되는 진도개는 진도개보육관리소의 사육장과 순천대학교 동물사육장내 애완견사육장에서 물과 사료를 자유급식 시키면서 사육하였다. 모든 수캐는 사육장의 견방당 1마리씩 단독사육을 원칙으로 하고 암캐는 1-3마리까지 합사 또는 단독사육 관리하였다. 또한 운동과 용변을 자유롭게 볼 수 있도록 운동장을 충분히 마련하여 주고 필요에 따라서는 필요한 운동을 운동장에서 시키도록 하였다. 본 연구를 위한 진도개의 선발은 진도군에서 사육되고 있는 진도개 순종중에서 외모심사규정에 의해 우수한 진도개를 선발하여 장차 인공수정 및 유전자원보존 등에 이용하기로 한다. 그리고 매년 개최되는 진도개품평회에서 입상한 입상견을 구입 또는 정액채취를 실시하여 우수한 종건의 유전자원을 확보하는 방안을 마련하고자 한다.

2. 정액채취와 원정액검사

정액채취는 2-4년생 진도개를 주당 1회씩 수압법으로 실시했다. 정액채취용 수캐는 정액채취대로 옮기고 10 ml tube를 깔대기에 연결시키고 음경을 마사지하여 발기와 돌출을 유도하여 돌출된 음경의 구선부위 (bulbus glandis)를 잡고 압력을 가하면서 채취하였다. 이때 음경에 상처를 주지 않고 적당한 압력을 주면서 2차 fraction (sperm-rich fraction)만을 채취하여 정상적인 정액만을 택하여 1시간 이내로 정액제조 실험실로 옮겼으며, 400×g로 약 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 37℃의 2 ml Ext I으로 희석하여 warm stage 위에서 정자생존율, 전진운동율(활력)을 조사하고 이를 다시 Hemocytometer와 spectrophotometer로 정자수를 조사하였다. 정액채취량과 총정자수 등에 개체차이가 있어 진도개의 일반적 정액성상을 조사하고 개체간의 차이에 관하여도 검토하였다.

Table 1. Composition of tris-buffer extenders for Jindo-dog semen freezing

Compounds	Extender I	Extender II
Tris	3.028 g	3.028 g
Citric acid, monohydrate	1.678 g	1.678 g
Fructose	1.000 g	1.000 g
Na-benzyl penicillin	0.060 g	0.060 g
Streptomycin sulphate	0.100 g	0.100 g
Egg Yolk	20.0 ml	20.0 ml
Glycerol	-	8.0 ml
D.W.	to 100 ml	to 100 ml
pH	6.53	6.48
Osmolarity	280 mOsm/Kg	1,370 mOsm/Kg

3. 희석정액의 단기 보존 검사

진도견 채취정액의 적정 희석액을 검토하기 위하여 희석정액은 생존율, 전진운동율(활력)과 농도를 조사하여 희석정액의 단기보존을 위한 실험을 수행하였다. 단기 보존을 위한 적정온도를 조사하기 위하여 5℃, 17℃, 38℃간에 비교 실험을 하였으며, 각 온도별로 4일까지 보존하여 희석정액의 활력과 정자의 운동성의 변화를 조사하였다. 또한 적정 희석액의 유무를 검토하고자 추진하였다.

4. 동결정액의 CASAs 검사

동결된 정액의 현미경검사는 주관적인 판단 및 평가가 수반되므로 보다 정확하고 객관적인 평가가 가능한 CASAs(Computer-assisted semen analysis : Hamilton)를 이용한 정액의 운동성을 조사하였다. 검사정액 10 μ l를 취하여 microcell slide에 넣고 현미경검사를 하였으며, 조사항목은 MOT(운동정자 비율, %), PROG(전진운동정자비율, %), VAP(정자의 초당 평균이동속도, μ m/sec), VCL(정자의 초당 평균곡선이동속도, μ m/sec), VSL(정자의 초당 평균직선이동속도, μ m/sec), ALH(측두거리, μ m)로 정액의 운동성을 종합적으로 조사 평가하였다.

5. 동결정액의 제조

희석정액은 생존율, 전진운동율(활력)과 농도를 조사하여 동결정액제조에 가능여부를 판단하였다. 동결보존 실험에 공시되는 정액은 전진운동율(활력) 70% 이상인 것만을 공시하였다. Tris-buffer는 Rota 등(1997)의 방법에 준하여 Ext I과 II로 제조하여 이용하였다. ml당 2×10^8 으로 정자를 조정하기 위하여 Ext I 희석정액을 보충하거나 조정하였고, 희석된 정액은 5°C cold room에서 약 2시간정도 방치하여 5°C까지 냉각시켜 같은 온도의 동량 Ext II를 약 1시간에 걸쳐 희석·평형을 유도하였다. 평형후 최종농도가 1×10^8 cells/ml 되게 조정하여 0.5 ml straw loading하면 straw내 총진정자수가 5×10^7 이 되도록하였다. 액체질소표면 5 Cm위에서 예비동결을 유도하였다. 예비동결된 straw는 액체질소에 침적하여 goblet에 담아 LN₂ tank에 보존하였다.. 용해는 70°C에서 5초간, 55°C에서 10초간, 38°C에서 20초간 실시하여 warm plate 위에서 활력과 전진운동성을 검사하고 인공수정에 이용여부를 판단하였다.

6. 동결정액의 용해와 생존율 조사

동결정액은 용해온도와 용해시간에 따라 생존율에 많은 차이를 보여 본 연구조건에 가장 알맞은 용해온도와 시간을 조사하고자 하였다. 일반적으로 55-70°C에서 약 5-8초 전후의 단시간용해방법과 37°C에서 약 10-30초간 장시간용해방법으로 대별된다. 따라서 용해 온도와 시간을 70°C에서 5초간, 55°C에서 10초간, 38°C에서 20초간으로 구분하여 실시하였고, warm plate 위에서 활력과 전진운동성을 검사하고 인공수정에 이용여부를 판단하였다.

7. 동결정액 희석액의 조성성분조사

Tris-buffer를 기본희석액으로 선정하고 여기에 glucose, fructose 및 sucrose의 첨가여부에 따른 가장 효과적인 완충액을 선발하고자 한다. 또한 개의 동결정액에는 동결보호제로 glycerol을 일반적으로 첨가하는데 다른 동결보호제의 첨가효과에 대하여도 조사하여 가장 효과적인 동결보호제와 적정농도를 조사하여 가장 적합한 완충액의 조건을 구명하고자 한다. 본 1차년도 연구과제에서도 동결보호제로 glycerol를 사용하였고, glycerol의 적정농도를 조사하고자 최종 glycerol 농도를 3%, 5%, 7%로 구분하여 비교실험을 하였다.

8. 자궁내 인공수정기구의 개발

자궁내 인공수정기구는 질경, balloon sheath 및 injection catheter로 구성되어 있는데 balloon sheath는 질경외부에 씌운 상태로 질내에 주입하여 공기를 주입하면 질내에서 풍선이 형성되어 질내부를 확장시켜 자궁경관입구를 명확하게 볼 수 있을뿐만 아니라 구선(bulbus glands)과 같은 효과로 진정효과를 동시에 얻을 수 있다. 또한 자궁경관을 통과하여 정액을 안전하게 주입할 수 있는 injection catheter 및 이러한 기구를 질내에 주입할 때 오염을 방지하기 위한 비닐 sheath로 구성되어있다. 자궁경관을 확인하고 injection catheter를 injection guard에 걸고 천천히 자궁경관을 통과시킨다. 자궁내 정액주입기인 인공수정기구는 개의 크기에 따라 대, 중 및 소로 제작되었으며, 자연교미와 거의 같은 느낌을 받을 수 있게 제작되어 시술이 매우 효과적이다.

9. 인공수정 적기 판정을 위한 기술 정립

발정 암캐의 수정 적기 판단은 인공수정 성공의 결정적인 영향을 미치므로 대상축에 대하여 여러 가지 적기판단 기술을 활용하여 시도하였다. 호르몬중 progesterone의 농도에 의한 적기 판정기술로 ICG-STATUS(synbiotics) 을 이용한 progesterone 수준이 2.0ng/ml 이상일 때 자궁내 인공수정을 시도하는 방법과 질세포의 변화에 따른 수정 적기 판정 기술은 질상피세포검사법에 의한 각화상피(cornified cell)를 조사한 결과에 따라 적기를 판정하여 시도하였고, 초음파의 의한 난소의 배란시기를 고려한 적기 판정을 하였으며, 또한 외음부 변화와 교미허용 반응에 대하여 관찰을 하고 수정적기를 조사하였다.

10. 임신감정 및 산자 생산

임신감정은 인공수정 후 약 30일경 초음파기기로 임신여부를 확인하였고, 임신된 개체는 개체관리를 하면서 분만실로 옮겨 분만유도를 하였고 분만시 산자수와 성비를 조사하였다.

11. 통계처리

본 연구는 백구와 황구간, 그리고 각 개체별 채취한 정액성상과 처리를 하면서 동결전후의 정액 활력과 생존율, CASA 검사로 정액의 운동성을 조사한 평균 결과에 관하여 SAS package를 사용하여 Duncan test를 실시하였다.



Fig. 1. Semen collection and artificial vagina of Jindo-dog.

제 2절 연구수행 결과

1. 동결정액을 이용한 인공수정기술의 개발

가. 자궁내 인공수정기구의 개발

1) 암컷생식기관의 구조조사

효과적인 자궁내 인공수정기구의 제작과 인공수정을 위해서 암컷생식기관의 구조를 정확하게 파악할 필요가 있다. 진도개의 암컷생식기관은 Fig. 2와 같이 외음부에서 자궁에 이르기까지의 모양이 활과 같이 굽어 있으며, 자궁경관의 입구에는 아래쪽으로 질원개가 위치해 있으며, 경관입구에서 자궁으로의 진입은 상방향 (약 45°)으로 향하고 있고 타 가축과 달리 추벽이 없는 것이 특징이다. 즉, 자궁경관의 입구를 정확하게 확인만 할 수 있다면 주입기로 자궁내 주입은 큰 어려움 없이 수행할 수 있을 것으로 판단된다. 만약 자궁경관내로 정액을 주입하지 못하고 자궁경관입구 또는 질내에 주입하면 질의 구조상 정액의 역류가 쉽게 일어날 뿐만 아니라 질내의 조건이 정자의 생존에 절대적으로 불리한 조건으로서 인공수정의 성공가능성이 줄어들 것이다. 이러한 불리한 점을 개선하기 위해서는 반드시 자궁내에 정액을 주입할 필요가 있다. 이 같이 암, 수컷의 생식기 구조를 정확하게 파악하고 인공수정기구의 제작과 인공수정 시 반드시 요구되는 상황이다.

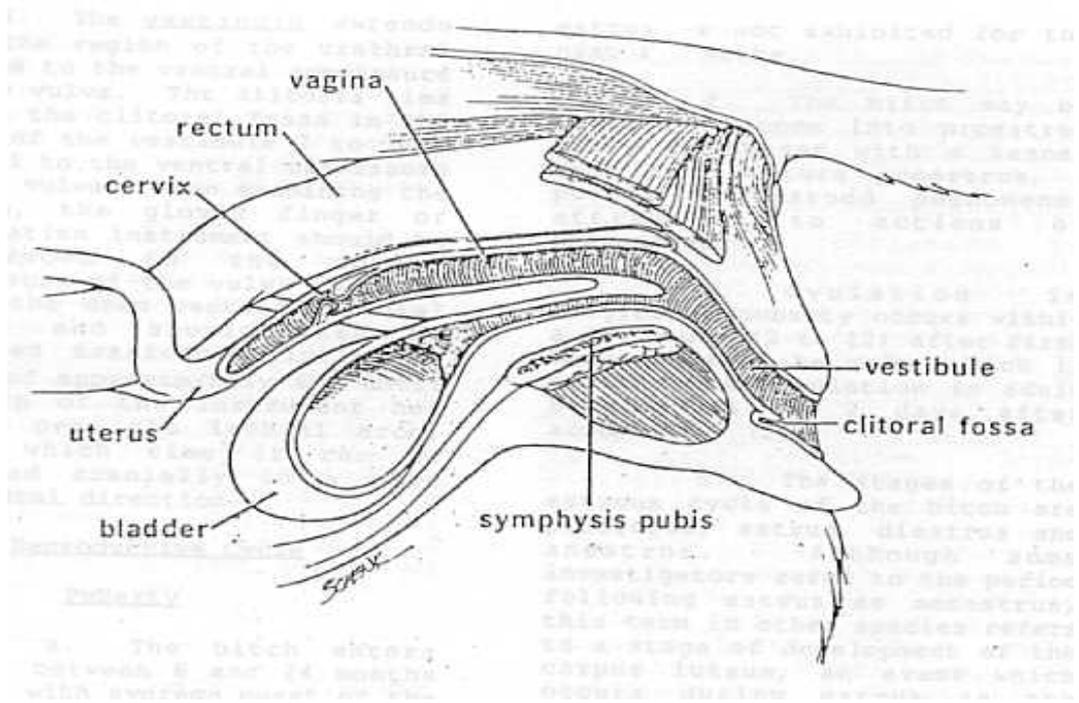


Fig. 2. Characteristic of reproductive organ in female dog.

2) 자연교미와 유사한 조건으로 인공수정기구 제작

개의 자연교미 시 음경의 구선 확대로 질내에 음경이 사정이 끝날 때까지 삽입되어 정액의 역류를 방지하게 된다. 이와 같은 자연상태의 원리로 인공수정기구를 제작하기 위한 구체적인 도면과 연구실에서의 시제품제작은 완료되었다. 개의 질은 자궁경관에 가까워지면서 매우 적은 직경으로 줄어들기 때문에 실제 주입기의 제작 시 이러한 면을 충분히 고려해야 할 것이다. 이러한 개의 생식기를 직접 도축해 암컷생식기를 관찰하고 이를 바탕으로 자연교미 시와 가장 유사한 모습으로 제작하였다.

3) Balloon sheath, vaginal endoscope 및 injection catheter의 구조결정

본 자궁 내 인공수정기구의 원리는 개의 생식기와 유사한 모양과 작용을 충분히 고려하여 제작하고자 하였다. 즉, 개의 질 구조상 질경의 주입없이는 자궁경관을 직접 확인할 수 없으므로 질경을 이용한 질의 직선화와 동시에 질경에 빛을 조사하여 자궁경관을 직접 확인할 수 있게 제작구조를 결정하였다. Balloon sheath는 스키프의 구선과 같은 원리를 이용함과 동시에 질을 확장함으로써 자궁경관입구의 공간을 확보하여 정확하게 경관입구를 확인할 수 있을 뿐만 아니라 자연교미 시 스키프의 구선과 같은 효과를 일으킴으로써 암컷의 안정화를 기할 수 있을 것이다. 또한 Injection catheter는 가능한 가는 크기를 택하였으나, 끝 부분을 둥글면서 약간 크게 만들어 자궁과 질에 상처를 입힐 가능성을 배제하고자 하였다.

4) 시제품제작 및 제작의뢰

위에서 설명한 자궁내 인공수정기구의 제작은 본 연구실에서 제작한 도면과 모형을 기본으로 하여 타 제작공장에 제작을 의뢰하여 시제품을 제작하고자 하였다. Vaginal endoscope의 제작은 빛을 제공하는 부분과 질경의 직경, 길이 등을 측정하여 제작하였다. Balloon sheath도 공기주입 시 balloon의 크기 및 위치해야할 부분을 정하여 제작하였으며 injection catheter는 가능한 적은 크기로 하였으나 끝 부분은 질과 자궁의 상처를 고려하여 둥글고 약간 크게 제작하였다. 그러나 balloon sheath의 제작은 크기에 따른 제작상의 어려움과 끝마무리의 문제 등으로 현재까지 보완중이며 곧 완전한 주입기가 제작 완료될 것으로 판단된다.

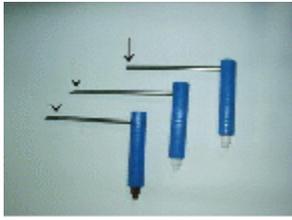
5) 자궁내 인공수정기구시제품의 개선보완

1차 년도에 제작한 자궁내 인공수정기구의 단점을 보완하여 보다 더 완벽한 자궁내 인공수정기구를 개선 보완하여 새로운 기구를 제작하였다. Fig. 3과 같이 자궁내 인공수정기구는 질경과 injection catheter 및 syringe로 구성되어 있다. 이들의 제작을 위하여 각각의 특성은 생식기의 구조적인 면을 고려하였다. 즉, 질경의 구조에서 질의 구조와 유사한 모양으로 제작하였고 또한 질경의 선단부위를 자궁경관입구의 모양과 유사하면서 최종적으로 질경의 선단부위와 자궁경관입구가 꼭 맞게 질경 선단부위에 약 45°로 제작하였다(A, B, C). 이는 질경을 자궁경관입구까지 주입한 후 경관의 축진과 조작에 매우 용이하게 적용될 수 있다. 또한 질경의 직경을 2단계로 즉, 선단부위는 직경을 작게 또는 후단부위는 직경을 크게하여 자궁경관 가까운 부분의 비탄력인 조직특성과 직경을 고려하였고, 후단부위의 질은 매우 탄력적이고 실제 관찰을 용이하게 하기 위해 직경을 크게 제작하였다. 그러나 injection catheter 제작에서 제작비의 관계로 기존 시장에 판매되고 있는 stainless재질로서 내경이 매우 작고 강도가 높은 재질을 구입하는데 한계가 있어 현재 제작 이용되고 있는 질경은 내경이 크고 강도가 약한 단점을 지니고 있다. 그래서 3차 년도에는 이 같은 용도에 맞는 재질을 찾고 재 가공하여 보다 효율적인 자궁내 인공수정기구를 제작하고자 한다.

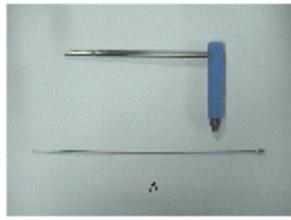
나. 동결정액을 이용한 인공수정기술의 정립

자궁내 인공수정기구에 의한 인공수정기법정립은 기구의 이용뿐만 아니라 자궁경관의 조작 등의 세부적인 문제를 이해를 요하기 때문에 자궁내 인공수정기구를 이용한 인공수정기술은 간단하지 않다. Fig. 3과 같이 개의 자궁경관입구와 자궁경관의 구조적인 특성 때문에 일반적인 가축의 인공수정같이 간단하지 않을뿐더러 많은 이해와 숙련이 요구된다(D). 특히 개의 자궁경관과 입구의 구조적인 특징 때문에 자궁경관의 조작 없이는 거의 불가능하다. 그리하여 질경을 주입하여 자궁경관입구까지 삽입 전진시킨 후 자궁경관을 복부축진으로 확인하여 자궁경관을 잡고 자궁경관의 기울려진 각도를 일직선상으로 조작하는 과정이 요구된다(D, E, F, G). 그런 후에 injection catheter에 정액syringe를 연결시켜 자궁내로 삽입시켜 정액을 서서히 주입 완료한다(H, I). 이때 injection catheter내에 잔류할 수 있는 정액의 완전한 주입은 syringe의 piston을 약 1-2 ml 후퇴시켜 공기층을 두고 주입하면 injection catheter내에 잔류하

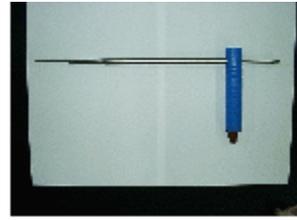
는 정액을 완전히 자궁내로 주입할 수 있다.



(A)



(B)



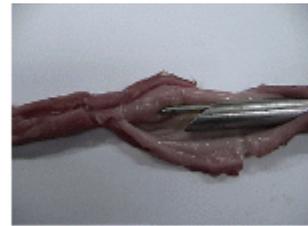
(C)



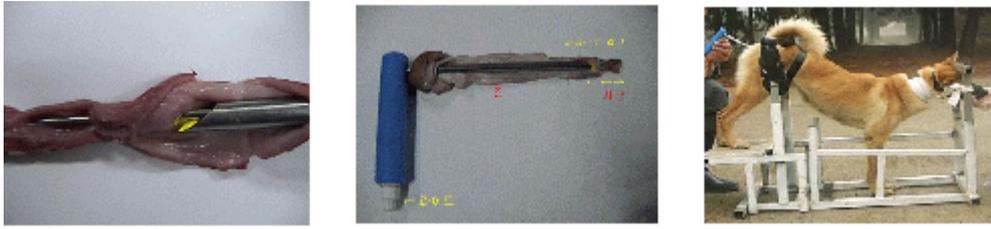
(D)



(E)



(F)



(G)

(H)

(I)

Fig. 3. Photograph of intravaginal inseminator and intravaginal insemination procedure. (A) Type of intravaginal inseminator, (B) Endoscope and injection catheter, (C) Assembly of intravaginal inseminator, (D) Vagina and cervix ox, (E) Cervix ox and endoscope probe of intravaginal endoscope, (F) Cervix ox and injection catheter, (G) Cervix ox and light of endoscope, (H) Insertion of endoscope into vagina, and (I) Intravaginal insemination.

다. 동결정액을 이용한 인공수정기술의 개발

1) Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류에 따른 침체의 손상정도

당의 종류에 따른 정자의 침체손상 정도는 Table 2에서와 같다. 정상 정자비율은 Fru+Tre, Fructose, Trehalose, Fru+Tre+Xyl, 구가 Fru+Xyl, Tre+Xyl, Xylose보다 유의적으로 높았다.(83.05.6, 82.33.1, 81.72.1, 81.05.6, vs 80.34.5, 76.73.8, 72.02.0). Yildiz 등(2000)은 정자의 운동성, 활력도 및 정상침체율은 32℃에서 20-30분간 평형 후 모든 처리구에서 유의적으로 감소하였다. 그러나 손상된 침체정자의 비율은 galactose, lactose, trehalose, maltose 및 sucrose를 첨가한 희석액에서 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. Woelder 등(1997)은 당은 급속냉각 시 정자세포에서 일어날 수 있는 손

상에 대하여 보호기능을 가지고 있고 또한 sucrose는 소 정자의 경우 trehalose보다 더욱더 보호기능이 있다고 하였다. Molinia 등(1994)은 1당류가 Tris-buffer에서 동결된 면양정자의 운동성을 보존하는데 2당류보다 더욱더 안정성이 있다고 보고하였다. Garcia와 Graham(1989)은 3당류는 소 정자의 용해 후 운동성의 보존에 1당류 또는 2당류만큼 효과적이지 못하다고 하였다. Yildiz 등(2000)은 glucose, lactose, raffinose를 제외한 거의 모든 당은 acrosome 손상을 감소시킨다고 보고하였다. 특히 2당류인 trehalose, sucrose 및 maltose는 용해 후 운동성을 촉진시키는 것 없이 침체손상률과 사멸정자율을 감소시키며, 반면 galactose, glucose를 제외한 1당류는 정상 침체율 및 활력도 뿐만 아니라 운동성까지 개선시켰다고 보고하였다.

Eosin B & Fast Green 염색 후 당의 종류에 따른 정자의 정상 정자비율은 Fru+Tre구가 Fructose, Trehalose, Fru+Tre+Xyl, Fru+Xyl, Tre+Xyl, Xylose보다 유의적으로 높았다(83.05.6, 82.33.1, 81.72.1, 81.05.6, 80.34.5, 76.73.8, 72.02.0). 특히 전진운동율과 정자의 침체의 이상비율은 수정율과 유의성이 매우 높은 관계로서 전진운동율과 정상정자의 침체비율이 가장 높은 Fru+Tre처리구가 가장 효과적인 것으로 판단되었다. 1당류인 fructose와 2당류인 trehalose의 혼합처리구가 타처리구보다 정자의 정상침체율과 전진운동율이 높은 것은 2당류인 trehalose가 침체손상률과 사멸정자율의 개선에, 1당류인 fructose가 정상침체율, 활력도 및 운동성까지 synergistic effect를 거두었다고 판단된다. 본 결과에서 1당류 또는 2당류 등의 단독첨가보다는 이들의 적절한 조합에 의한 첨가가 동결용해 정자의 침체손상을 줄여주고 운동성을 높여주는 효과를 얻을 수 있는 것으로 판단된다.

Table 2. Effect of sugar kind in Tris-buffer on post-thaw acrosome damage rate of post-thaw spermatozoa

*Values with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

Kind of sugar / Type of sperm	Fructose	Trehalose	Xylose	Fru+ Tre	Fru+ Xyl	Tre+ Xyl	Fru+ Tre + Xyl
Normal sperms	82.3±3.1 ^{ab}	81.7±2.1 ^{ab}	72.0±2.0 ^c	83.0±5.6 ^a	80.3±4.5 ^{ab}	76.7±3.8 ^b	81.0±5.6 ^{ab}
Abnormal sperms	17.7	18.3	28.0	17.0	19.7	20.0	19.0

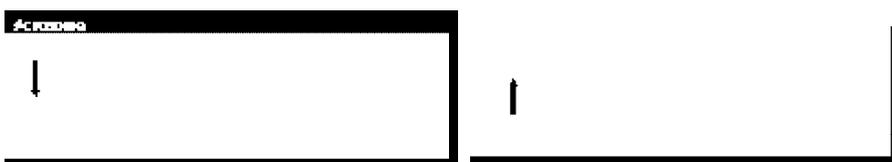
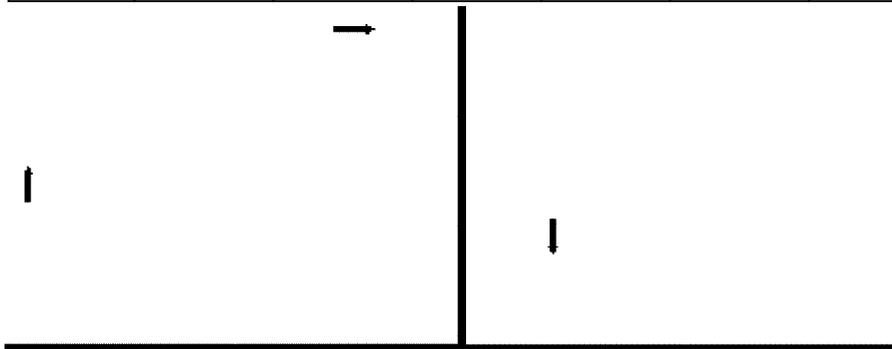


Fig. 4. Canine sperm stain for acrosome damage with Eosin B & Green stain under a inverted microscope(1,000x).

2) Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류에 따른 동결, 용해정자의 활력도

CASA로 평가한 자료는 Table 3에서와 같다. 운동성은 Fru+Tre, Fru+Tre+Xyl, Tre+Xyl, Fru+Xyl, 구가 Xylose, Trehalose, Fructose구보다 유의적으로 높았다(796, 753, 748, 7111, vs 704, 6615, 6312%; P<0.05). 또한 수정율과 유의성이 높은 전진운동율에 있어서도 Fru+Tre, Fru+Tre+Xyl, Tre+Xyl, Fru+Xyl, 구가 Xylose, Trehalose, Fructose구보다 유의적으로 높았다(677, 643, 626, 618, vs 602, 5713, 5310%; P<0.05).

1당류와 2당류를 혼합 첨가함으로써 훨씬 높은 운동성과정상정자 첨체율을 얻을 수 있으므로 써, 1당류와 2당류 사이의 기능적 차이가 당의 종류에 따라 개 정자의 보호기능의 형태와 위치 등이 다른 것으로 판단된다. 즉, 1당류가 할 수 있는 기능과 2당류가 할 수 있는 기능이 다르다면 이들을 적절한 비율로 혼합하여 첨가하는 것은 궁극적으로 동결용해 정자의 운동성, 활력도 뿐만 아니라 정상첨체율을 향상시켜 이들 정자를 이용할 경우 수정에 성공할 가능성을 크게 높일 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3. Effect of sugar kind in Tris-buffer on post-thaw motility analyzed in canine

Kind of sugar	MOT (%)	PROG (%)	VAP (mic/s)	VCL (mic/s)	VSL (mic/s)	LIN (%)	STR (%)	ALH (mic.)
Fructose	63±12 ^b	53±10 ^b	64±2	75±3	58±1	73±2	87±1	3.9±0.2
Trehalose	66±15 ^b	57±13 ^b	62±9	73±10	57±8	76±2	89±2	3.6±0.5
Xylose	70±4 ^b	60±2 ^b	64±2	77±2	58±2	72±2	87±1	4.0±0.1
Fru+ Tre	79±6 ^a	67±7 ^a	69±14	82±17	62±12	72±2	86±1	4.3±0.8
Fru+Xyl	71±11 ^b	61±8 ^b	66±6	79±7	60±5	72±1	87±2	4.1±0.3
Tre+ Xyl	74±8 ^b	62±6 ^b	67±4	80±4	61±4	73±1	86±1	4.1±0.2
Fru+ Tre + Xyl	75±3 ^{ab}	64±3 ^b	69±9	83±10	62±8	73±2	87±1	4.2±0.3

*Values with different superscripts were significantly different (p<0.05).

3) 자궁내 인공수정기술 보급

전국 가축인공수정사의 보수교육(2000, 2001, 2002)에서 “개의 자궁내 인공수정기술”이라는 제목으로 전국 8개도의 순회강의 참여하여 기술적인 보급을 실시하였다. 한우 및 젓소의 사육규모 감소 의한 가축인공수정사들의 어려움에 새로운 돌파구를 마련하기 위한 대안으로서 많은 관심을 끌었던 강의였다. 이제까지 대부분 자궁내 인공수정을 완벽하게 구사하지 못하고 질내주입에 의한 인공수정을 시술함으로써 수태율의 저하로 이어져 실제 사육자와 인공수정사 및 수의사들의 관심이 낮았었다. 그러나, 정확하게 자궁내 정액을 주입함으로써 높은 수태율과 인식의 변화를 가져와 이제는 개의 자궁내 인공수정을 불가능한 것으로 판단하지 않고 거의 대부분의 인공수정사 및 수의사들이 가능한 것으로 판단하고 있을 뿐만 아니라 실제 개 인공수정으로 영업을 하고 있는 인공수정사와 수의사들도 있다.

4) 동결정액을 이용한 자궁내 인공수정으로 산자생산

동결정액을 이용한 자궁내 인공수정 시 질내 인공수정보다 유의적으로 높은 수태율을 보여 동결정액을 이용한 인공수정 시에는 반드시 자궁내 정액을 주입해야 높은 수태율을 얻을 수 있다는 결과를 얻었다. 이는 동결정액을 질내 주입 시에는 정액의 생존조건이 좋지 않아 정자의 생존기간이 짧아짐으로써 자궁내로 침투할 수 있는 정자수가 급격하게 줄어든다. 즉, 신선정액과 달리 동결정액은 반드시 자궁내에 정액을 주입함으로써 정자의 생존기간을 늘려줌으로써 수정 가능성을 동시에 높일 수 있다. Table 4에서와 같이 자궁내 인공수정 시 26두 중 21두가 분만을 하여 86.6%의 분만을 얻었으나, 질내주입 시에는 15두중 6두만이 분만을 하여 40.0%의 성적을 얻어 유의적인 차이를 보였다. 또한 분만자건의 수를 보면 질내주입(2.8 ± 1.2)보다 자궁내 주입(4.2 ± 1.6) 시 유의적으로 높은 산자수를 얻어 경제적인 측면을 고려해도 반드시 자궁내 주입이 요구된다고 판단된다. 그러나 실제 자궁내 정액주입을 위해서는 인공수정사 및 수의사라 할지라도 쉽게 가능한 것이 아니라 개만의 생식기구조의 특성과 주입방법 등을 충분히 숙지하고 많은 연습이 요구된다. 인공수정사들의 교육 시 이러한 점을 누차 강조해도 기존의 가축(소, 돼지)의 인공수정과 비슷한 것으로 쉽게 생각하고 실제 응용 시 많은 어려움을 보고하였던 바가 있었다.

Table 4. Whelping rate and litter size for frozen-thawed dog semen inseminated intravaginally or same equipment used

Items	Intravaginal	Intrauterine
No. of bitches inseminated ^a	15	26
No. of bitches whelping (%)*	6 (40.0)	21(86.6)
No. of pups born	17	89
No. of pups per litter (Mean±S.E.)	2.8±1.2	4.2±1.6

a Total of 50x10⁶ spermatozoa used per in intra-uterine and 3 times more concentration (150x10⁶ spermatozoa) in intra-vaginal insemination. Bitches were inseminated twice 48 h apart.

* Whelping rate differed significantly (P < 0.05).

2. 동결정액희석액 및 제조기술 개발

가. 진도개 동결정액 제조를 위한 기초기술정립

1) 진도개 채취정액의 일반 정액성상 조사

가축과 달리 진도개의 정액은 정자수, pH, 삼투압에 차이가 있는 것으로 알려져 본 연구를 수행함에 있어 진도개의 정액성상에 관하여 알아보하고자 5두의 진도견을 공시하여 Table 5과 6의 결과를 얻었다.

Table 5. General characteristics of semen in Jin-do dog

No. of dog	No. of collection times	Volume of semen (ml)	Conc. of sperm (10 ⁸ /ml)	No. of sperm (10 ⁸)	Viability (+++)	Survivability (%)	pH	Osmolarity
5	40	3.33	1.49	5.18	72.55	74.31	6.54-6.96	304.3-311.8

Table 6. Comparison of individual semen characteristic in Jib-do dog

Name of dog	No. of collection times	Volume of semen (ml)	Conc. of sperm (10^8 /ml)	No. of sperm (10^8)	Viability (+++)
A	8	4.88	1.36	6.62	75.00
B	8	3.94	1.68	6.60	79.20
C	11	3.82	2.21	8.46	85.50
D	9	2.83	1.02	2.56	70.56
E	4	1.20	1.19	1.68	52.50

진도개의 일반 정액성상을 살펴본 결과 정액량의 경우 개체간에, 채취방법에 따라, 2분획에 3분획 혼입정도에 따라 정액량이 차이가 있을 수 있었으나 평균적으로 3.33 ml 이었다. 개체간에도 정액량이 1.20-4.88 ml의 분포를 보여 차이가 있었는데 이는 종견의 나이와 관련이 있는것으로 사려되었다. 정자농도는 평균 1.49×10^8 /ml 였으며 개체간에 큰차이는 없었고, 총정자수는 평균 5.18×10^8 정액량과 같은 경향을 보였다. 정액의 평균 전진운동율(활력 : +++)은 72.55% 였으며 70% 이상의 정액만 동결정액 제조 실험에 공시하는 기준을 설정하였다. 생존율은 평균 74.31%로 나타났으며 사충이 부분적으로 많은 것을 관찰할 수 있었다. 한편 조사된 pH는 6.54-6.96 이었고 삼투

압은 304.3-311.8로 조사되었다.

2) 희석정액의 보존기한 및 보존온도에 따른 운동성 검사

채취정액의 인공수정 이용방법으로 희석액 첨가후 단기보존에 의한 방법과 동결정액 제조 후 장기보존에 의한 이용방법으로 대별된다. 그리고 보존을 위한 희석액의 조성에 따라 보존온도와 기한에 영향이 있으며, 동결정액을 제조하는 과정에서 정액 처리에 가장 효과적인 온도를 고려하고자 희석정액의 보존온도와 보존기한에 관한 실험을 처리별로 3반복 실시하여 얻은 결과 Table 7와 8에서와 같다.

Table 7. Effect of temperature and period of preservation on the viability of semen

Temp.(°C)	Immediately	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
5	80.0	73.3	58.3	40.0	25.0
17	80.0	76.7	40.0	23.3	20.0
38	83.3	10.0	-	-	-

Table 8. Effect of temperature and period of preservation on the motility of semem after CASA

Temp.(°C)	Periods	MOT	PROG	VAP	VCL	VSL	LIN	STR	ALH
5	Immed.	73.3	65.3	88.3	106.7	81.7	73.3	88.3	5.0
	Day 1	62.7	54.7	77.3	98.7	72.7	69.3	90.0	4.9
	Day 2	47.0	40.0	75.0	97.0	69.3	67.7	86.3	5.4
	Day 3	32.0	25.3	63.3	86.3	57.3	66.0	86.5	5.6
	Day 4	40.0	33.5	60.5	82.5	55.5	66.0	86.5	4.8
17	Immed.	78.7	72.3	96.0	117.7	89.7	74.3	90.0	5.7
	Day 1	77.3	60.3	72.0	93.0	66.7	66.5	85.0	5.2
	Day 2	34.0	27.3	69.3	100.0	62.7	65.7	88.0	5.6
	Day 3	29.0	23.5	57.0	90.5	48.5	57.0	82.5	6.0
	Day 4	26.0	22.5	43.0	73.0	38.0	54.5	86.0	5.5
38	Immed.	80.7	71.7	93.0	115.3	85.7	72.3	89.3	6.0
	Day 1	6.0	6.0	107.0	163.0	103.0	63.0	96.0	9.3

정액의 보존온도와 보존기한을 현미경검사에 의한 활력과 CASA검사에 의한 운동성을 살펴 본 결과 두 실험 공히 5℃에서 좋은 결과를 얻었으며, 5℃에서 적어도 2-3일간 보존이 가능하고, 인공수정에 이용이 가능하기 때문에 본 희석액으로 양호한 결과를 얻었다. 진도견 정액 역시 정액의 보존온도는 5℃에서 보존하고 정액의 처리과정도 5℃ 항온실에서 작업하는 것이 가장 효과적이라고 판단되었으며, 본 희석액을 동결정액 연구에 이용 착수하였다.

3) CASA를 이용한 진도견의 원정액과 희석정액의 운동성 비교검사

또한 원정액에 희석액을 첨가하여 단기보존 및 동결정액으로 제조하여 이용하는데 희석액이 운동성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 일반적인 현미경검사에 의한 활력과 생존율은 시각적으로 주관적인 경향과 편차가 생길 수 있으므로 좀더 정확하고 객관적인 평가방법으로 CASA 장비를 이용한 운동성을 검사하였는데 결과는 Table 9과 같다.

Table 9. Comparison of motility of fresh and extended semen in Jin-do dog

Type of semen	No. of examined	MOT	PROG	VAP	VCL	VSL	LIN	STR	ALH
Fresh	7회	79.3	56.0	89.1	120.6	72.6	55.5	76.3	6.65
Extended	4회	68.5	55.0	67.5	94.7	59.9	61.4	84.5	5.40

원정액에 희석액 첨가후 정액의 운동성을 비교한 결과 운동정자의 비율은 10%정도 감소되었으나 전진운동정자율(활력 : +++)은 거의 유사한 결과를 나타냈다. 그리고 초당 정자가 움직이는 거리 역시도 다소 떨어지는 경향을 보였으나 수태에 지장을 초래하는 않을 것으로 판단되어 동결정액 제조를 위한 희석액으로 가능성이 있다고 판단

되었다.

4) Glycerol 평형 후 농도에 따른 정액의 운동성 검사

Glycerol의 최종 농도에 맞게 3회에 걸쳐 소량씩 20분 간격으로 1시간동안 평형을 시킨 후 동결전 glycerol의 농도별 정액의 운동성을 살펴 본 결과는 Table 10과 같다.

Table 10. Comparison of semen motility after glycerol equilibration

Conc. of glycerol(%)	No. of examined	Microscope		CASA	
		Viability(+++)	Survival (%)	MOT (%)	PROG (%)
3	7	62.86	72.86	77.50	62.00
5	4	63.75	72.50	69.50	56.00
7	3	58.33	71.67	78.00	67.50

Glycerol 평형후 정액의 운동성을 살펴본 결과는 동결과정에 들어갈 수 있는 충분한 조건이었으며 Glycerol의 농도에 따른 정액 운동성에 관해서는 현미경 검사에 의한 결과는 3-5%가 다소 좋은 결과를 보인 반면 CASA검사 결과는 오히려 7%에서 좋은 경향을 나타냈다. Glycerol 농도별 동결정액의 용해후 운동성이 동결정액 제조 및 제품을 위해서 중요한 결과를 낼 것으로 판단되었다.

5) 동결정액 용해 온도와 시간, Glycerol 농도에 따른 정액의 운동성 검사

진도건의 유전자원 보존 및 인공수정용 동결정액 생산을 위한 Glycerol 농도에 따

른 정액의 운동성과 동결정액의 용해온도 및 시간에 따른 정액의 운동성을 검사한 결과는 Table 11, 12와 같다.

Table 11. Effect of glycerol concentration on motility of post-thaw semen in Jin-do dog

Conc. of glycerol(%)	No. of examined	Microscope		CASA	
		Viability(+++)	Survival (%)	MOT (%)	PROG (%)
3	22	26.24	31.48	18.00	14.00
5	8	22.00	24.99	12.00	5.00
7	2	7.50	10.00	19.00	12.00

Table 12. Effect of thawing temperature and time on viability of frozen semen

Thawing cond.	No. of examined	Microscopic viability (+++)	Microscopic survival (%)
38°C, 20 sec	14	25.46	28.67
55°C, 10 sec	9	23.69	28.96
70°C, 5 sec	7	23.21	27.08

동결정액을 액체질소 Container에 침지 보존 1일 이상 경과후 융해하여 동결정액의 운동성은 전진운동정자율(활력 : +++) 비율이 40% 이상, 생존율(MOT)이 60% 이상의 수준이 되어야 인공수정시 좋은 결과를 얻을 수 있으며, 상품으로서의 가치가 인정되는 바 주요 요인별로 살펴 본 결과 총 32회 실험중 기준이상의 운동성을 보유한 정액은 5회였으며, 가능성이 있는 경우는 14회로서 기준 이상은 16% 정도, 가능성(30+++)
 이상은 44% 정도 였다. 아직 완벽한 동결정액의 상태라 할 수는 없지만 위에서 얻은 결과로 보아 활력, 생존율 및 운동성이 좋은 동결정액 제조가 가능하리라 판단되었다.

Glycerol 농도별 정액의 운동성은 3% 수준의 최종농도에서 다소 좋은 결과를 나타냈으며 3-5% 수준선에서 보완실험을 하면 되리라 판단된다. 그리고 융해조건에 따라 동결정액의 운동성에 영향을 미치기 때문에 38℃에서 20초간, 55℃에서 10초간, 70℃에서 5초간 융해하여 현미경검사를 실시한 바 거의 차이가 없었으며 38℃에서 20초간 융해하는 것이 다소 좋았고, 일반적으로 생식세포의 동결융해 시 이용되는 방법이다.

나. 진도개 동결정액 제조 및 적정 총진정자수 정립

1) 동결 융해후 정자두부의 손상여부 조사

진도개의 동결정액 융해후 정액의 성상을 확인하고자 Eosin-Nigrosin 염색법을 이용한 생존율과 Well-Awa 염색법을 이용한 첨체정상율을 조사하였고, 정액내 기형을 연구한 Rose-Bengal 염색법을 이용하여 조사하였는데 그 결과는 Table 13과 같으며, 정자두부의 손상여부는 정자두부의 정상성 즉 첨체의 정상 여부를 확인하였다.

Table 13. Analysis of post-thaw spermatozoa characteristic after various staining method

Staining method	Survivability (Eosin-Nigrosin)	Normal acrosome (Well-Awa)	Abnormality (Rose-Bengal)
No. of examined	11	13	13 회
Rates (%)	61.5	79.3	12.3 %

동결정액 용해후 인공수정에 이용될 수 있는 정액의 정상 기준은 생존율 60%, 침체 정상율 70%이상기형율 15% 이하를 정상으로 평가하는데, 본 검사결과 생존율은 61.5%, 침체정상율은 79.3%,기형율은 12.3%로서 정상기준 이상의 결과를 얻었으며, 특히 진도견의 정액은 침체정상율 즉 정자두부 손상율이 높아 수태에 영향을 많이 미치는 것으로 알려져 있는데 본 조사결과 양호한 것으로 나타났다. 기형율은 정상 기준내의 성적을 나타냈으나 다소 기형율이 높은 경향을 보였다. 그러나 전체적으로 조사결과 동결정액 제조 및 인공수정에 이용할 수 있는 성적을 얻었으므로 동결정액 제조기술의 정립과 동결정액 생산체제가 가능한 것으로 사려 되었다.

2) 정자의 생존율과 전진운동을 현미경 조사

기초실험에 의한 동결정액 용해후 염색검사에 의한 정액성상 즉 생존율, 침체정상율, 기형율을 조사한 결과 양호한 결과를 얻어 본격적인 동결정액 제조를 수행하면서 동결정액 생산을 위한 채취 원정액의 성상과 동결 전후 정액의 생존율과 전진운동을 (활력)을 현미경검사로 조사하였는데 그 결과는 Table 14, 15와 같다.

Table 14. Characteristics of fresh semen after collection

No. of examined	Volume (ml)	Conc. of sperm ($10^6/ml$)	No. of total sperm(10^8)	Viability	Survivability
66	3.8	142.1	386.6	79.2%	89.0%

Table 15. Comparison of viability of cooled and post-thaw semen with microscopic analysis

No. of examined	Cooled semen		Post-thaw semen	
	Viability(%)	Survival(%)	Viability(%)	Survival(%)
47	73.6	82.3	51.1	64.9

진도건을 이용한 정액 채취는 66회를 시도하여 정자수가 부족하지 않고 동결전후 활력과 생존율이 동결정액을 제조할 수 있는 기준 이상의 경우인 47회만 동결정액을 제조하였다. 66회 채취한 평균 정액량은 3.8 ml, 정자농도는 ml당 142백만, 총정자수는 387백만정도 였으며, 원정액의 활력과 생존율을 현미경 검사결과 79.2%와 89.0%로서 약 80%와 90% 수준이었다. 그중 동결정액을 제조할 수 있는 47회의 동결전 냉장정액의 활력과 생존율은 원정액 보다 다소 감소한 73.6%와 82.3%로 양호하였으며, 동결정액의 용해후 활력과 생존율은 51.1%와 64.9%로 기준이상의 결과를 보였다. 실험수행결과 동결정액 제조는 채취후 71.2% 정도가 가능하여 상당한 수준에 올랐으나, 채취시 정액처리 부분의 다소 개선 필요성을 판단할 수 있었고, 제조된 동결정액은 상당히 양호하므로 동결정액 제조기술이 정립되었다고 사려되었다.

3) CASA검사에 의한 객관적인 생존율과 운동성 조사

보다 객관적인 평가를 하기 위한 방법으로 CASA 장비를 이용한 생존율, 전진운동율과 운동속도를 측정,조사하는 방법을 도입하여 동결정액 제조후 46회 수행하였는데 그 결과는 Table 16과 같다. 현미경검사시 활력과 생존율은 51.1%와 64.9%였고 CASA검사에 의한 움직이는 생존정자의 비율(MOT)은 64.9%였고, 왕성한 전진운동정자의 비율(PROG, 활력)은 54.1%로 현미경검사의 생존율, 활력검사 성적과 비교하였을 때 생존율은 같았으며, 전진운동정자 비율(활력)은 유사한 경향을 나타냈다. 따라서 CASA검사는 객관적인 성적평가의 수단으로 효과가 높아 동결정액 생산을 위한

검사방법으로 활용이 바람직하다고 판단되었다.

Table 16. CASA results of post-thaw semen

No. of exam.	MOT (%)	PROG (%)	VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	LIN (%)	STR (%)	ALH (μm)
46	64.9	54.1	74.3	89.2	68.4	72.1	87.3	4.4

4) 최적의 총진정자수 정립을 위한 개체간 동결능력 조사

인공수정을 위한 동결정액의 스트로네 총진정자수의 정립을 위해서는 진도개의 개체간 동결능력의 조사가 필요하며, 활력에 따라 최적의 총진정자를 결정할 수 있는데 5두의 진도견 개체간의 비교실험 및 황구와 백구간의 비교를 채취 정액성상과 동결정액의 용해후 활력과 생존율에 관하여 살펴본 결과는 Table 17, 18과 같다.

Table 17. Comparison of semen characteristic of individual dog

Type	Dogs	No. of examined	Volume (ml)	Conc. (10 ⁶ /ml)	Total sperm(10 ⁸)	Viability (%)	Survival (%)
White Jin-do dog	1st	3	3.6	70.0	185.0	68.3	78.3
	4th	16	4.9	73.0	216.0	78.8	88.1
	6th	12	4.9	38.6	177.7	75.4	85.8
	Mean	31	4.8	59.4	198.2	76.5	86.3
Yellow Jin-do dog	2nd	22	3.4	206.9	619.6	82.0	91.8
	5th	13	2.0	229.8	441.6	80.8	90.8
	Mean	35	2.9	215.4	553.5	81.6	91.4

Table 18. Comparison of individual semen viability and survival rate in post-thaw semen

Type	Dogs	No. of examined	Cooled semen		Post-thaw semen		CASA test	
			Viability	Survival	Viability	Survival	MOT	PROG
White	1st	1	80.0	85.0	50.0	65.0	71.0	55.0
	4th	8	73.1	80.6	47.5	60.6	58.3	48.6
	6th	5	67.0	76.0	50.0	65.0	63.0	51.4
	Mean	14	71.4	79.3	48.6	62.5	60.9	50.1
Yellow	2nd	21	75.0	84.0	54.5	68.3	70.6	59.2
	5th	12	73.8	82.9	47.9	61.7	60.3	50.3
	Mean	33	74.5	83.6	52.1	65.9	66.7	55.9

백구와 황구간의 비교에 의한 채취 정액성상은 백구의 경우 정액량은 많으나 정자농도가 낮아 총정자수가 2억 수준이며, 황구는 백구와 반대의 경향으로 정액량은 적으나 정자농도가 높아 총정자수가 5억5천정도로 백구의 2배이상 수준을 보였고, 원정액의 활력과 생존율은 약 5%수준으로 황구가 높아 정자의 생존성이 좋은 것으로 나타났다. 또한 동결정액의 제조시 내동성과 동결 용해후 생존성을 살펴본 결과도 황구가 백구보다 약 3-5%수준 높은 경향을 보여 백구보다는 황구가 채취정액의 성상 및 동결정액의 내동성과 생존율에 우수한 것으로 사려 되었다. 그리고 개체간에도 채취정액의 성상과 동결정액의 내동성과 생존율 등에 차이가 있어 황구 2호 가 가장 우수

하였으며, 백구 4, 6호가 다소 낮은 경향을 보여 개체간의 차이에 따라 총진정자수를 조정할 수 있을 것으로 판단되었다.

4) 동결정액 생산 및 최적의 총진정자수 조사를 위한 인공수정

동결정액 제조기술의 정립에 따라 동결정액을 생산하였으며, 스트로내 총진정자수는 약 25백만 수준으로 제조하여, 인공수정시는 1회수정시 2개의 정액을 용해하여 수정하고 1두당 2회 수정하므로써 총 4개의 정액이 사용되도록 제조하였다. 개체별 동결정액 생산 내역 및 인공수정에 공여된 내역은 Table 19와 같다.

Table 19. Items of production, using for AI and storage of frozen semen

Items	Dogs	No. of processing	No. of frozen straw maked	No. of analysis	No. of frozen straw produced	No. of straw transfer	No. of straw preserved
Total		47	797(17)	47	750(16)	243	507
White	1st	1	12	1	11	11	0
	4th	8	60	8	52	52	0
	6th	5	33	5	28	28	0
	Mean	14	105	14	91	91	0
Yellow	2nd	21	490	21	469	110	359
	5th	12	202	12	190	42	148
	Mean	33	692	33	659	152	507

동결정액 생산은 그간 750개를 생산했으며 1두, 1회 16개를 생산해 암컷 4두분의 인공수정용 정액을 생산하였고, 인공수정을 위해 진도견 보육관리소로 243개 정액을 인수인계하여 약 60두분의 인공수정용 정액을 공여하였다. 또한 현재 500여개로써 125두분의 정액을 보관하고 있다.

백구정액은 전량(91개), 황구정액은 152개 이관하였고, 현재 보관분은 황구정액만 500여개 이다. 또한 현재 인공수정에 공여한 상태로 약 30두 정도 인공수정을 하는데 인공수정 결과인 수태율과 산자수 등은 3차년도에 얻을 수 있으며 또한 최적의 충전 정자수도 3차년도에 최종결과로 얻을 수 있으리라 판단되었다.

다. 진도견 동결정액 생산에 미치는 개체별 영향

1) 채취후 동결정액 제조와 실패 원인

진도견 5두중 백구 3두(1, 4, 6호)와 황구 2두(2, 5호)를 이용한 144회의 정액채취를 시도하여 기준이상의 조건으로 동결정액을 제조한 경우와 실패의 경우 실패원인을 확인해 본 결과는 Table 20과 같다.

Table 20. Analysis of success and failure for frozen semen production depend on individual dogs

Dogs	No. of collection	Success	Failure	Cause of failure				
				Under sperm #	Inferiority of semen	Inferiority of cooling	Inferiority of frozen	Etc
W1	23	5 (21.7)	18	12 (66.7)	3	1	1	1
W4	36	18 (50.0)	18	5		2	11 (61.1)	
W6	16	5 (31.3)	11	6 (54.5)	1		1	3
White	75	28 (37.3)	47	23 (48.9)	4	3	13 (27.7)	4
Y2	41	30 (73.2)	11		3 (27.3)	2	5 (45.5)	1
Y5	28	16 (57.1)	12	1	8 (66.7)	2	1	
Yellow	69	46 (66.7)	23	1	11 (47.8)	4	6 (26.1)	1
Total	144	74 (51.4)	70	24 (34.3)	15 (21.4)	7 (10.0)	19 (27.1)	5

기타 : 무정자, 채취관 파손, 채취거부

대상축 진도견 5두를 이용한 144회의 정액채취를 시도하여 기준이상의 조건으로 동결정액을 제조한 경우는 74회로서 51.4% 수준이었으며 실패의 경우 실패원인을 확인해 본 결과는 정자수 미달이 24회(34.3%), 동결불량 19회(27.1%), 원정액불량 15회(21.4%) 순으로 나타났다.

백구와 황구간의 비교에 있어서는 백구는 75회, 황구는 69회를 시도하여 28회(37.3%)와 46회(66.7%)가 성공하여 황구의 동결정액 제조율이 높았고, 실패원인을 보면 백구는 정자수 미달이 23회(48.9%), 동결불량이 13회(27.7%)였으며, 황구의 경우는 원정액 불량이 11회(47.8%), 동결불량이 6회(26.1%)로 백구는 정자수 미달이 많았고, 황구는 원정액 불량이 많은 상이한 결과를 보였다.

백구와 황구 개체간의 결과를 살펴보면 동결정액 제조율이 가장 높은 개체는 황구 2호로 73.2%였고, 가장 저조한 개체는 백구 1호로 21.7% 였으며, 실패원인은 정자수 미달이 66.7%로 주된 원인이었다.

2) 채취정액(원정액)의 성상

총 채취한 144회중 동결정액 제조가 가능했던 74회의 원정액에 관한 정액성상과 활력(전진운동율) 및 생존율을 현미경검사로 살펴본 결과는 Table 21과 같다.

Table 21. Characteristic of collected semen in Jin-do dog

Dogs	No. of collected	Volumn (ml)	Conc. (x10 ⁶ /ml)	#. sperm (x10 ⁶)	Viability (%)	Survival (%)
W1	5	2.98	154.4	445.0	89.0	93.0
W4	18	3.84	146.1	512.8	86.9	93.6
W6	5	6.32	54.8	271.0	74.0	86.0
White	28	4.13	131.3	457.5	85.0	92.1
Y2	30	3.30	203.8	652.6	84.5	92.2
Y5	16	2.23	247.4	526.7	83.8	92.2
Yellow	46	2.93	218.9	608.8	84.2	92.2
Mean	74	3.68	144.59	434.30	83.91	91.61

진도견 5두의 정액성상을 조사한 결과 평균 정액량은 3.68 ml, 정자농도는 ml당 165.2백만, 총정자수는 418.1백만 정도였으며, 원정액의 활력과 생존율은 83.9%와 91.6% 수준이었다. 그리고 백구와 황구의 비교에 있어서는 백구의 경우 정액량이 4.13

ml, 정자농도 131.3백만, 총정자수 457.5백만 이었고, 원정액의 활력과 생존율은 85.0%와 92.1%였으며, 황구는 정액량이 2.93 ml, 정자농도 218.9백만, 총정자수 608.8백만 이었고, 원정액의 활력과 생존율은 84.2%와 92.2%로서 정액량은 백구가 많았던 반면 정자농도는 황구가 높았고 그 영향으로 총정자수 역시 황구가 많은 결과를 보였으며, 원정액의 활력과 생존율에 있어서는 유사한 결과였다.

또한 개체별 정액성상을 살펴보면 정액량의 경우는 백구 6호가 6.32 ml로 가장 많았고, 황구 5호가 2.23 ml로 가장 적은량을 보였다. 정자농도는 반대의 상황으로 황구 5호가 247.4백만으로 가장 높았고, 백구 6호가 54.8백만으로 가장 낮은 농도를 나타냈다. 총정자수는 정자농도와 유사한 경향으로 황구 2호가 652.6백만으로 가장 많았으며 역시 백구 6호가 2712.0백만으로 가장 적었다. 원정액의 활력과 생존율은 대부분의 개체가 유사한 결과였으나 백구 6호가 가장 낮아 74.0%와 86.0%였다.

따라서 정액성상에 있어서 백구와 황구간에 차이가 있었으며, 개체간에도 차이가 있는 것을 알수 있었고, 원정액의 활력과 생존율은 기준이상의 경우만을 조사하였으므로 큰 차이는 없었으나 개체간에 다소 떨어지는 개체의 특성을 고려한 동결정액 제조가 필요하다고 사려 되었다.

3) 동결정액 제조 전,후의 활력과 생존성

동결정액 제조가 가능한 74회의 경우에 대하여 glycerol 평형이 완료된 동결전 냉장정액과 동결된 정액을 용해후의 활력과 생존율을 조사하였고, 동결정액은 스트로당 정자수를 2,500-3,000만 수준으로 조정하여 제조하여 조사한 결과는 Table 22와 같다.

Table 22. Viability and survivability of pre- and post-production of frozen semen

Dogs	Pre-frozen		Post-frozen		No. of frozen straw
	Viability	Survivability	Viability	Survivability	
Dogs	83.0	87.0	50.0	64.0	14.0
W1	78.9	86.1	50.6	62.8	15.6
W4	67.0	76.0	50.0	65.0	6.6
W6	77.5	84.5	50.4	63.4	13.7
White	77.3	84.2	54.3	67.3	22.2
Y2	75.6	84.1	48.1	62.2	17.4
Y5	76.7	84.1	52.2	65.5	20.5
Yellow	67.00	83.71	44.45	64.31	13.75

전체적으로 glycerol 평형이 완료된 동결전 냉장정액의 활력과 생존율은 76.6%와 83.7% 였으며, 동결 용해후 활력과 생존율은 50.8%와 64.3%로서 양호한 결과였고, 동결정액 제조량은 1회 평균 15.7개 동결정액을 생산하였다. 백구와 황구간의 비교에 있어서 냉장정액의 활력과 생존율은 유사한 결과였으나 동결 용해후 활력과 생존율은 황구가 다소 좋은 결과였고, 동결정액 제조량도 백구는 13.7개, 황구는 20.5개 수준으로 황구가 다소 좋은 결과를 보였다.

한편 개체간의 비교에 있어서는 동결전 냉장정액의 활력과 생존율에 있어서 백구1호가 83.0%와 87.0%로 가장 좋았고, 백구 6호가 67.0%와 76.0%로 가장 낮아 차이가 있었으나 동결 용해후의 활력과 생존율은 개체간에 큰 차이가 없었으나 황구 5호가 다소 낮은 경향을 보였다. 그리고 동결정액의 제조량은 황구 2호가 22.2개로 가장 많았고, 백구 6호가 6.6개로 가장 적어 개체간의 제조량 차이가 있었다.

동결 전,후 활력과 생존율을 비교한 결과를 종합하면 백구와 황구간에는 기준이상의 정액으로 제조를 시도하였으므로 큰 차이가 없었으나 개체간에 있어서도 냉장정액이 개체간에 다소 차이를 보였으나 동결완료된 정액을 용해하여 검사한 결과는 유사한 결과를 보여 동결정액 제조기술은 정립되었다고 할 수 있으며 동결정액의 제조량은 원정액 정액성상의 영향으로 개체간의 차이가 인정되어 동결정액 제조가 우수한 중축선발의 필요성이 있음을 확인할 수 있었다.

4) 개체별 CASA 검사

동결정액 제조후 용해하여 현미경검사 결과 백구와 황구간에 그리고 개체간에 큰 차이가 없어 좀 더 객관적이고 정밀한 검사 수단인 CASAs 장비를 이용한 정액의 운동성에 대하여 생존율, 전진운동율과 운동속도를 측정한 결과는 Table 23과 같다.

Table 23. Results of individual analysis by CASA

은 64.3%, 활력은 50.8%로서 생존정자의 비율은 유사하였으며 전진운동정자 즉, 활력에 있어서는 CASAs 검사에서 다소 높게 나타났고, 현미경검사가 엄격한 검사가 되었음을 알 수 있었다. 그리고 정자의 운동속도인 초당 평균속도(VAP)는 75.2 $\mu\text{m}/\text{sec}$, 곡선이동속도(VCL)은 91.0 $\mu\text{m}/\text{sec}$, 직선이동속도(VSL)는 69.7 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 및 측두거리(두부 이동폭 : ALH)는 4.5 μm 로서 동결정액 용해후 양호한 결과를 나타냈다.

백구와 황구간의 비교에 있어서는 전 검사항목인 운동성과 운동속도에 있어서 유사한 결과를 보였고, 개체간에는 운동성에 있어서 MOT와 PROG의 경우 백구 6호와 황구 5호가 다소 낮은 결과를 보였으며, 운동속도에서도 황구 5호가 다소 떨어지는 결과를 나타냈다. 이는 동결 용해후 현미경검사를 한 결과와도 유사한 경향을 보여 동결정액 제조를 위한 현미경검사 기술 역시 숙련되었다고 판단 되었다.

라. 진도견 동결정액 생산에 미치는 계절적 영향

1) 계절별 정액 채취와 실패원인

144회의 정액채취를 시도하여 계절별로 동결정액 제조가 가능한 경우와 실패원인을 계절별로 살펴본 결과는 Table 24와 같다.

Table 24. Analysis of success and failure for frozen semen production depend on season examined

Season	No. of collection	Success	Failure	Cause of failure				
				Under sperm #	Inferiority of semen	Inferiority of cooling	Inferiority of frozen	Etc
Spring	63	36 (57.1)	27	11 (40.7)	4	2	8 (29.6)	2
Summer	36	12 (33.3)	24	8 (33.3)	5	1	9 (37.5)	1
Fall	16	7 (43.8)	9	3	3	2	1	
Winter	29	19 (65.5)	10	2	3	2	1	2
Total	144	74 (51.4)	70	24 (34.3)	15	7	19 (27.1)	5

* Etc : Azoospermia, damage of collection tube, refuge for semen collection

총 144회 정액채취를 시도하였고 그중 74회인 51.4%가 동결정액 제조가 가능하였고, 계절별로 살펴보았을 때 겨울, 봄, 가을, 여름순으로 65.5%, 57.1%, 43.8%, 33.3%의 결과를 얻었다. 그리고 실패원인별로 살펴보았을 때 정자수 미달, 동결불량, 원정액불량 순으로 34.3%, 27.1%, 21.4% 였고, 정자수 미달과 동결불량은 주로 봄과 여름의 주된 실패원인으로 작용하였으며, 가을과 겨울에는 특정 실패원인이 영향을 미치는 않았다. 따라서 동결정액 제조를 위해서 집중적인 채취시도는 겨울과 봄에 시도하는 것이 유리할 것으로 판단되었다.

2) 계절별 채취정액(원정액)의 성상

계절별로 채취된 정액중 동결정액 제조 가능한 경우의 원정액 성상 검사를 수행한 결과는 Table 25와 같다.

Table 25. Characteristic of collected semen depend on season

Season	No. of collected	Volumn (ml)	Conc. ($\times 10^6/\text{ml}$)	#. sperm ($\times 10^6$)	Viability (%)	Survival (%)
Spring	36	3.01	194.7	504.5	82.1	91.8
Summer	12	3.26	170.6	567.5	87.1	93.8
Fall	7	3.07	198.4	636.1	89.3	94.3
Winter	19	4.27	173.8	599.5	85.8	91.1
Mean	74	3.40	147.50	461.52	86.08	92.75

정액량은 겨울철에 4.27 ml로 가장 많았고, 봄과 가을이 적었으며, 정자농도는 봄과 가을에 194.7백만과 198.4백만으로 높았고, 여름과 겨울에 170.6백만과 173.8백만으로 낮았다. 총정자수는 가을, 겨울, 여름, 봄의 순으로 가을에 정자농도의 영향으로 636.1 백만의 총정자수를 보여 가장 많았다. 그리고 원정액의 활력과 생존율에 대하여 계절별로는 큰 차이는 없었으나 가을과 여름에 다소 좋은 결과를 보였고, 특히 가을에 89.3%와 94.3%를 나타냈다.

3) 계절별 동결정액 제조 전,후의 활력과 생존성

Glycerol 평형 후 동결 전 냉장정액의 활력과 생존율을 그리고 동결 후 용해한 정액의 활력과 생존율을 계절별로 살펴보고, 계절별로 동결정액으로 제조된 양을 비교한 결과는 Table 26과 같다.

Table 26. Viability and survivability of pre- and post-production of frozen semen according to season

Season	Pre-frozen		Post-frozen		No. of frozen straw
	Viability	Survivability	Viability	Survivability	
Spring	74.7	83.3	51.9	66.0	17.8
Summer	79.2	86.3	52.5	66.3	19.4
Fall	77.9	86.4	50.7	62.1	18.9
Winter	79.7	83.9	50.3	62.4	17.0
Mean	62.30	84.97	41.08	64.20	14.62

동결전 냉장정액의 활력과 생존율을 계절별로 비교한 결과는 큰 차이가 없었으며 동결 용해후 활력과 생존율에 있어서도 계절적으로 유의적인 차이는 없었으나 여름이 동결 전,후의 활력과 생존율에 있어서 다소 우수한 결과를 보였다. 그리고 동결정액 제조하기 위하여 스트로내 충전정자수를 2,400-3,000만 정도로 충전하여 1회 평균 제조량을 계절별로 살펴본 결과 역시 계절적으로 큰 차이는 없었으며, 여름철에 평균 19.4개를 생산하는 것으로 다소 많았다.

4) 계절별 동결정액 CASAs 검사

동결정액에 대한 계절별 CASAs 검사에 위한 정액의 운동성과 운동속도를 살펴

본 결과는 Table 27과 같다,

기준 이상의 조건으로 제조된 동결정액에 대하여 용해후 좀더 객관적인 평가를 위하여 CASAs검사를 실시하였고 이를 계절별로 검토한 결과 정자의 운동성인 MOT와 PROG의 경우 큰 차이는 없었으나 여름철에 67.2%와 57.2%로 다소 우수하였으며 정자의 운동속도인 VAP, VCL, VSL 등의 경우 역시 여름에 우수한 결과를 보였다.

Table 27. Effect of season on CASA results of frozen semen

Season	No. of examined	MOT (%)	PROG (%)	VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	ALH (μm)
Spring	34	65.0	54.7	74.1	87.9	68.8	4.2
Summer	11	67.2	57.2	84.4	100.1	77.8	4.8
Fall	7	66.9	56.1	73.0	90.4	66.7	4.6
Winter	17	63.5	53.2	72.6	89.9	66.8	4.7
Mean	69	65.65	55.30	76.03	92.08	70.03	4.58

- 1) MOT : motility, 2) PROG : progressive motility,
 3) VAP : average path velocity, 4) VCL : curve linear velocity,
 5) VSL : straight-line velocity, 6) ALH : amplitude of lateral head displacement

따라서 진도건의 동결정액 제조를 위한 계절적 요인을 살펴본 결과 정액채취 후 동결정액 제조 성공률은 겨울과 봄에 유리하였던 반면 동결정액의 제조 후 동결정액의 운동성은 여름철에 우수한 것으로 판단되었다.

3. 진도개관리 및 농가인공수정

가. 시험용 진도개의 선발관리

1) 외모심사에 의한 종건선발

전문심사원 2명이상의 심사와 진도개심사표에 의해 합격된 진도개 중 70점 이상 획득한 진도개를 종건으로 23두를 선발하고 체형, 외형, 종부사항, 진료사항, 부모견 등을 기록할 수 있는 관리카드를 작성하였다.

2) 종건의 정액채취와 번식력조사

23두의 종건을 대상으로 수지법에 의해 정액을 채취하여 활력, 생존율 검사결과 1회 채취하여 정자수는 1.76억, 활력은 74.0, 생존율은 82.0의 평균을 보였고 2두는 정액 채취가 불가능 하였다. 또한 정액검사가 가능하고 1회 사정시 정자수 0.6억 이상, 활력이 65이상인 종건을 대상으로 1회 이상 자연교미를 통한 수태능력 검증한 결과 검사대상 15두의 종건 모두가 수태능력을 보였고 평균 산자수는 4두였다.

3) 번식기 질병 유/무의 조사와 방역관리

23두의 종건을 대상으로 교미를 통해 전이되는 전과성 성기육종(T.V.T)을 검사한 결과 2두가 질병에 이환되어 있었고 2두 모두 외과적인 방법으로 종양을 제거하였으나 그중 1두는 재발하여 도태시켰으며 생리적인 건강상태를 알아보기 위해 혈액화학치 검사를 실시한 결과 특별한 이상을 발견할 수 없었고 전염병과 내·외부 기생충 예방을 위하여 방역프로그램을 작성·운영하였다.

4) 종빈건의 번식력 및 개체변이 조사

종모견과 교미를 통해 종빈건 번식력, 개체변이를 관리카드에 기록하였다. 검사대상 17두의 종빈건은 평균 산자수는 4두였고 그 중 1두는 2회 가임기기중 1번만 수태(1두생산)하였고 같은 모색끼리 종부하였을 때 백구는 10회 출산 모두 백구를 생산하고 황구는 6회 출산 중 1회 만 다른 모색견을 생산하였고 흑구와 호반은 생산건의 모색이 다양하였다.

나. 인공수정적기 판단기준 정립 및 시범적 농가인공수정 실시

1) 우수 종건의 보급과 인공수정기술의 정립을 위하여 시범농가에 인공수정 실시

인공수정기술 정립을 위하여 임신 가능한 암캐 25두를 대상으로 Table 28과 같이 1회 인공수정 정자수 6,000만단위로 하여 2회(2일 간격) 자궁내 인공수정일 실시하였으며 25두 중 출산확인 두수는 3두(평균산자수 4.6두), 불임 두수는 3두였고 19두는 미출산견이다.

Table 28. Summary of AI with frozen semen in farm

연번	동결정액 개체내역(총)			인공수정 대상 증빈건(우)													인공수정		산자수		
	개체번호	모색	1회 인공수정 정자수(만)	개체번호	모색	발정일	초음파검사 시 난포크기(mm)			질상피세포검사 시 무핵각화상피(%)			호르몬검사 시 kit 반응 결과			교미허용반응 적극 소극 거부				1차	2차
							일시	일시	일시	일시	일시	일시	일시	일시	일시	일시	일시	일시			
1	m-2호	황	6,000	14호	백	4/1	4/9	4/11	4/13	4/9	4/11	4/13	4/9	4/11	4/13	4/9	4/11	4/13	4/11	4/13	불임
							3.5	4	4.2	40	60	95	-	-	-	적극	적극	적극			
2	m-2호	황	6,000	16호	황	모름	5/5	5/7	5/9	5/5	5/7	5/9	5/5	5/7	5/9	5/5	5/7	5/9	5/7	5/9	임4
							3.8	4.8	-	50	50	50	-	-	-	적극	소극	소극			
3	m-5호	황	6,000	17호	황	모름	5/2	5/4	5/6	5/2	5/4	5/6	5/2	5/4	5/6	5/2	5/4	5/6	5/4	5/6	임2수4
							-	-	-	30	40	80	-	양성	양성	적극	적극	적극			
4	m-2호	황	5,000	18호	백	4/20	4/28	4/30	5/2	4/28	4/30	5/2	4/28	4/30	5/2	4/28	4/30	5/2	4/30	5/2	불임
							4	7	-	40	80	90	-	-	-	소극	적극	적극			
5	m-2호	황	6,000	19호	백	모름	5/30	6/1	6/4	5/30	6/1	6/4	5/30	6/1	6/4	5/30	6/1	6/4	6/1	6/4	
							-	-	-	50	50	95	음성	양성	양성	거부	거부	거부			
6	m-5호	황	6,000	22호	백	5/1	5/13	5/15	5/17	5/13	5/15	5/17	5/13	5/15	5/17	5/13	5/15	5/17	5/15	5/17	
							-	3.6	7	-	-	40	-	-	-	거부	적극	적극			
7	m-4호	백	6,000	27호	백	모름	5/4	5/6	5/9	5/4	5/6	5/9	5/4	5/6	5/9	5/4	5/6	5/9	5/4	5/6	
							4.4	7	-	70	80	-	-	-	적극	적극	거부				
8	m-4호	백	6,000	28호	백	5/8	5/13	5/15	5/17	5/13	5/15	5/17	5/13	5/15	5/17	5/13	5/15	5/17	5/15	5/17	
							-	-	-	20	50	90	-	양성	양성	소극	적극	적극			
9	m-4호	백	6,000	29호	백	모름	5/1	5/3	5/6	5/1	5/3	5/6	5/1	5/3	5/6	5/1	5/3	5/6	5/1	5/3	임4
							4	4.5	-	60	70	75	-	-	-	적극	적극	소극			
10	m-4호	백	6,000	30호	백	모름	5/1	5/3	5/6	5/1	5/3	5/6	5/1	5/3	5/6	5/1	5/3	5/6	5/1	5/6	불임
							-	-	64	30	60	80	음성	양성	양성	적극	적극	적극			
11	m-6호	황	6,000	31호	백	5/2	5/7	5/11	5/13	5/7	5/11	5/13	5/7	5/11	5/13	5/7	5/11	5/13	5/11	5/13	
							-	4.2	7	20	70	90	-	-	-	소극	적극	적극			
12	m-2호	황	6,000	33호	백	5/1	5/9	5/11	5/13	5/9	5/11	5/13	5/9	5/11	5/13	5/9	5/11	5/13	5/9	5/11	
							-	-	-	80	90	-	양성	양성	-	적극	소극	거부			

다. 최적의 인공수정적기 판단기법 정립

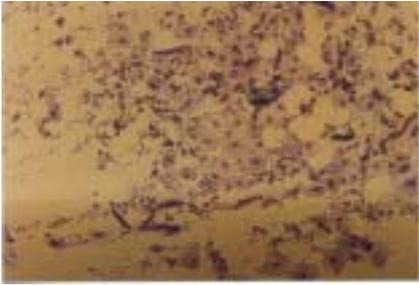
1) Hormone의 농도에 의한 판단기준 정립

ICG-STATUS-PRO(synbiotics)을 이용하여 progesterone level이 2.0 ng/mL이상 일 때 자궁내 인공수정을 2회(1회 정자 주입 6,000만단위, 1회 · 2일간격) 실시하였으

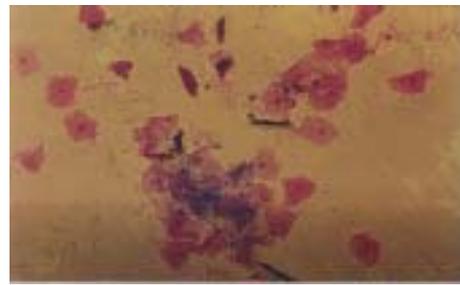
며 이의 경우 초음파검사에 의한 난포의 측정이 곤란한 10두를 대상으로 자궁내 인공 수정을 실시하였고 11두 1두는 출산(6두생산), 10두는 미출산하였다.

2) 질세포의 변화에 따른 수태적기 조사

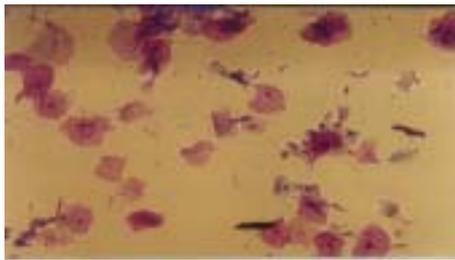
인공수정 대상견 25두를 3회에 걸쳐 질상피세포검사법에 의한 무핵각화 상피를 조사 하였다. 무핵각화상피의 숫자가 유핵원형상피·유핵각화상피의숫자보다 많아질 때 (60%이상) 발정한 암캐는 매우 적극적인 교미허용반응을 보였고 무핵각화상피가 50% 이상 일 때 자궁내 인공수정을 2회(1회 정자 주입 6,000만단위, 1회·2일간격) 실시 하였다.



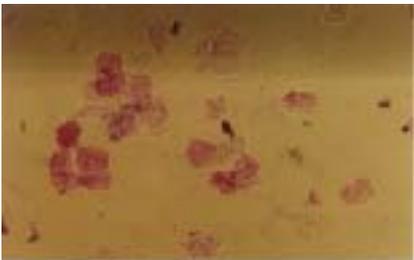
(A)



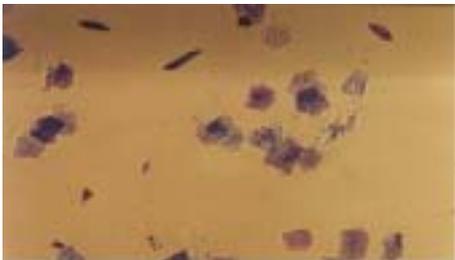
(B)



(C)



(D)



(E)

(F)

Fig. 5. Monitoring of vaginal cytology following the presence of vulva swelling and serodanguineous discharge as Day 1 (200X). A) Day 1, B) Day 9, C) Day 10, D) Day 11, E) Day 13 and F) Day 15.

Fig. 6. Detection of follicle size by ultrasonograph for optimal AI point.

4) 외음부 변화와 교미허용반응관찰에 의한 수태적기 조사

인공수정 대상 25두 모두를 정자사정 능 제거한 수캐에 교미허용반응을 검사한 결과 출혈이 있는 후 약 8일째부터 교미에 대한 적극적인 관심을 갖기 시작했으며 교미의 허용은 1주일 정도 지속되었다. 또한 교미허용기에는 엄지손가락으로 질에서 회음부로 압박하면서 밀었을 때 강하게 후지로 버티거나 질·회음부를 만졌을 때 수축반응을 보이는 것이 관찰되었으며 대부분의 외음부상태는 출혈이 멈추고 팽팽한 충혈기를 지나 약간 수축되기 시작한 시기였다. 질 상피세포 검사법에 의한 무핵각화상피의 비율이 40%이상 이면 대부분 교미에 적극적 이었으며 난포배란 3일 전·후에서 교미에 적극성을 띠었다. 그러나 일부의 시험견에서 배란기에도 불구하고 교미에 매우 소극적이거나 거부반응을 보였으며 또한 교미허용기가 15일 이상되는 암캐도 발견되었다. 위와 같이 인공수정적기를 찾기 위하여 혈액내 progesterone level(Hormone농도) 측정, 초음파검사, 질각화상피검사, 교미허용반응을 관찰해본결과 Hormone농도측정은 정확한 발정 개시일 확인과 2일 간격의 주기적인 혈청검사가 필요하여 경제성 및 현장적용에 애로가 있으며 초음파에 의한 배란시기 포착은 가장 정확한 인공수정적기를 판단할 수 있는 반면 모든 대상개체에 100% 확인이 곤란하며 농가인공수정시 기기의 운반이 용이치 않으며 질각화상피의 검사나 엄지를 이용한 질·회음부압박 및 수축반응은 현장에서 적기판단이 용이하나 정확한 수정적기를 찾기는 곤란하다. 그러므로 인공수정의 수태율을 높이기 위해서는 반드시 초음파를 이용한 난소검사가 병행되어야 한다고 판단된다.

라. 진도견 동결정액 인공수정에 관한 연구

1) 진도견 자연교미

진도견의 인공수정 기술 개발을 위한 인공수정을 시도하기에 앞서 진도견의 자연 교미에 의한 25두의 결과를 대조구 성격으로 살펴 본 결과는 Table 29와 같다.

Table 29. Production pups following natural mating in Jin-do dog

Father	Mother	No. of mating	No. of pups	Average pups	♀	♂
White	White	15	78	5.2	40	38
Yellow	Yellow	10	48	4.8	22	26
Total/Mean		25	126	5.00	62(49.2%)	64(50.8)

일반적으로 진도견의 자연교미에 의한 수태율은 시도하는 교미방법의 차이가 있고, 조사 방법의 차이 때문에 정확한 수태율을 얻기 어렵다. 따라서 수태율의 언급은 생략하고 총 25두 자연교미의 임신축에 관하여 자료 조사를 하였는데 126두가 d생산되어 평균 산자수는 5.0두였고, 성비는 암컷이 62두(49.2%), 수컷이 64두(50.8%)로서 기본 성비에 근접한 결과를 얻었다.

2) 진도견 총진정자수에 따른 자궁내 인공수정

동결정액 제조 기술의 정립과 인공수정 기구 및 기술의 정립에 따른 인공수정을 동결정액의 총진정자수에 따른 수태율과 평균산자수, 성비등을 고려한 인공수정시 적정 총진정자수를 검토하기 위하여 실시한 결과는 Table 30과 같다.

Table 30. Production of pups following intrauterine insemination depend on sperm concentration per straw

Sperm conc. 10 ⁶ sperm	No. of inseminated	No. (%) of pregnancy	No. (%) of delivered	Mean pups	Sex	
					♀ (%)	♂ (%)
50-60	25	17(68.0)	15(60.0)	4.7	36(51.4)	34(48.6)
25-30	25(11)	2(18.2)	?	3.5	?	?

() : No. of pregnancy

충진정자수를 5,000-6,000만으로 제조된 군과 2,500-3,000만으로 제조된 2처리구로 비교 검토하였는데 2,500-3,000만 처리구는 인공수정 후 임신감정 시기 및 분만이 이루어지지 않았으므로 결과가 다소 미흡하지만, 현재 임신감정된 11두중 2두가 임신되어 18.2%의 수태율을 보였고 복중내 산자수는 평균 3.5두 수준으로 조사되었다.

그러나 5,000-6,000만 처리구의 인공수정 결과는 25두 인공수정하여 17두가 임신하여 68.0%의 수태율을 그중 15두가 정상분만하여 분만율은 60.0%를 나타냈고, 평균 산자수는 4.7두로 확인되었다. 또한 암, 수 성비는 암캐가 51.4%, 수캐가 48.6%로 다소 암캐가 많은 것으로 나타났다.

이 결과로 볼 때 진도건의 인공수정시 상기 제조된 동결정액과 인공수정 방법으로 시도시 적정한 인공수정 충진정자수는 5,000-6,000만 수준이 바람직한 것으로 판단되었다. 이는 자연교미의 결과에서 볼 수 있드시 평균산자수가 5.0두와 4.7두로 거의 차이가 없었으며 수태율이 68% 수준이면 일반 기존에 개발된 가축의 인공수정 수태율과 유사한 결과이므로 인공수정상에 문제가 없음을 재확인할 수 있었다.

3) 교배 내역별 인공수정

5,000-6,000만의 충진정자수로 부(정액)의 모색과 모(암캐)의 모색을 고려한 인공수정 후 결과에 관한 내역을 살펴 보면 Table 31과 같다.

Table 31. Results of intrauterine insemination with frozen semen

Father	Mother	No. of inseminated	No. (%) of pregnancy	Mean pups produced	♀ (%)	♂ (%)
백	백	9	6 (66.70)	29 (4.8)	15 (51.7)	14 (48.3)
백	황	2	1 (50.0)	4 (4.0)		4 (100)
황	황	6	4 (66.7)	18 (4.5)	9 (50.0)	9 (50.0)
황	백	8	4 (50.0)	19 (4.8)	12 (63.2)	7 (36.8)
계		25	15 (60.0)	70	36 (51.4)	34 (48.6)

교배 내역에 따른 수태율을 고려했을 때에는 백구x백구의 경우와 황구x황구의 경우가 66.7%로서 우수한 경향을 보였으며 평균산자수를 고려하였을 때에는 암캐가 백구였을 때 산자수가 4.8두로서 다소 우수한 경향을 나타냈다. 이 또한 인공수정시 좋은 결과를 얻기 위해서 참고가 될 수 있다고 사려 되었다.

4) 인공수정 적기 판정을 위한 기술 정립

가) 발정 확인 유무

인공수정시 발정 확인 유무에 따른 수태율과 평균산자수 등을 조사한 결과는 Table 32와 같다.

Table 32. Effect of estrus confirmation on pregnancy and mean pups following

intrauterine insemination

Estrus confirmation	No. of inseminated	No. (%) of pregnancy	No. (%) of delivered	Mean pups	♀	♂
Confirm	17	12(70.6)	11(64.7)	51(4.6)	27	24
Unconfirm	8	5(62.5)	4(50.0)	19(4.8)	9	10
Total	25	17	15	70	36	34

발정이 확인된 개체는 25두중 17두였고 인신은 12두로 70.6%의 수태율을 나타냈고 분만은 11두가 되어 분만을 64.7%로서 발정이 미확인되고 다른 적기관정이 동원된 경우는 발정이 확인된 경우보다 다소 떨어지는 경향이 나타났다.

나) Hormone의 농도에 따른 판단기준 정립

ICG-STATUS-PRO (Synbiotics)를 이용하여 Progesterone 수준이 2.0mg/ml이상일 때 자궁내 인공수정을 2회에 걸쳐 실시하였는데 공시견 25두중 교미 허용반응을 보이는 때를 기준으로 2일간격으로 검사한 결과 발정일을 아는 17두 개체중 호르몬 양성 반응(Progesterone 수준이 2.0mg/ml이상)을 보이는 것은 발정일로부터 9일부터 15일째였으며 평균은 11.6일이었다. 따라서 11일 이전 양성반응을 보이는 구와 11일 이후 양성반응을 보이는 구간의 비교 검토하여 살펴본 결과는 Table 33과 같다.

Table 33. Effect of day of estrus response on pregnancy and maen pups following intrauterine insemination

Response from estrus	No. of inseminated	No. (%) of pregnancy	No. (%) of delivered	Mean pups	♀ (%)	♂
11 ≥	9	7	77.8	32(4.6두)	16(50.0)	16
11 <	8	4	50.0	19(4.8두)	11	8
Total	17	11	64.7	51(4.6두)	27(52.9)	24

호르몬 양성반응을 보이는 일에 따른 수태율과 산자수를 살펴 본 결과는 11일이나 11일 이전에 양성반응을 보이는 구가 수태율 77.8%로 11일 이후 양성반응을 보이는 구보다 우수한 것으로 나타났으며 평균산자수의 경우는 큰 차이가 없었다. 즉, 발정일로부터 인공수정일은 호르몬 양성반응을 보이는 시점은 평균 11일경에 수정시키는 것이 좋은 결과를 얻을 수 있다는 것이 입증되었다.

다) 질세포의 변화에 따른 수정 적기 판정

공시 대상축 25두에 대하여 질 상피세포 검사법에 의한 각화상태(cornified cell)를 조사한 결과 호르몬 양성반응을 보이는 때 전체적으로 각화상태는 20%-95%로 다양하였고 평균 70.8% 수준이었다. 그리고 수정 2일전의 각화상태는 56.0% 수준이었고 수정일(1차)은 70.8%, 수정 2일후(수정 2차)는 81.2%를 나타냈다. 이를 고려하여 수태축과 비수태축간의 2일간격으로 각화상태율을 비교한 결과는 Table 34와 같다.

Table 34. Effect of change of vaginal epithelial cells on pregnancy and maen pups following intrauterine insemination

Status of vaginal cells	Total	Before 2 days	1st AI	2nd AI
Pregnancy	67.9%	56.7%	70.3%	76.7%
Non-pregnancy	71.5%	55.0%	71.5%	88.0%

수태시와 비수태시 질세포의 각질화상태에 따른 평균 %를 수정 2일전, 수정일, 수정 2일후 검토한 결과 수태와 비수태에 크게 영향을 미치지 않은 것으로 나타났으며 적기 판정을 위한 판단 기법으로 활용하는데에는 다소 한계가 있음을 확인할 수 있었다.

라) 초음파 검사에 의한 난소검사로의 적기 판정

공시축 25두를 대상으로 난포의 배란시기를 검사하기 위하여 좌측 난소를 검진하였는데 16두만(64%)이 난소의 위치 및 난포의 발육을 조사할 수 있었고, 호르몬 양성반응을 보이는 인공수정 시기에 배란점이 관찰된 개체는 9두였다.

그와 관련하여 검사 가능 유무에 따라, 인공수정시 배란점 확인 유무에 따른 수태율과 산자수 등 결과를 살펴 본 결과는 Table 35와 같다.

Table 35. Effect of possibility of ultrasonograph detection on pregnancy and maen pups following intrauterine insemination

Ultrasonograph	No. of examined	No. (%) of pregnancy	No. (%) of delivered	Mean pups	♀	♂
가 능	16	9	56.3%	41(4.55)	23(56.1)	18(43.9)
불가능	9	6	66.7%	29(4.83)	13(44.8)	16(55.2)

초음파검사가 가능 유무에 따라서는 초음파검사가 불가능한 개체에서 수태율과 산자수가 다소 높았던 것으로 나타나 초음파 검사의 가능 유무는 인공수정 결과에 상관이 없음을 알 수 있었다.

다음은 인공수정시 배란점 확인 유무에 따른 인공수정 수태율과 산자수에 관하여 살펴본 결과는 Table 36에서와 같다.

Table 36. Effect of detection of ovulation point by ultrasonograph on pregnancy and mean pups following intrauterine insemination

Ovulation	No. of examined	No. (%) of pregnancy	No. (%) of delivered	Mean pups	♀	♂
No	7	5	71.4	22(4.4)	12(54.5)	10(45.5)
Yes	9	4	44.4	19(4.8)	11(57.9)	8(42.1)

인공수정시 초음파검사 결과 배란전인 미배란 상태에서 인공수정한 결과와 배란확인 후 인공수정한 결과를 비교한 결과로서 인공수정시 미배란 확인후 인공수정한 처리구가 71.4%의 수태율로 보다 우수한 결과를 얻을 수 있었고, 산자수는 큰 차이가 없었다. 따라서 인공수정 적기 판정을 위한 초음파검사는 검사가능 유무는 적기판정과 무관하나 인공수정 시점에서 난포가 발육된 상태로 미배란시 인공수정하는 것이 보다 효과적인 것으로 나타나 적기 판정기술로 바람직하리라 판단되었다.

마) 교미허용 반응에 따른 적기 판정

공기 대상축 25두에 대하여 정자 사정능력을 제거한 수캐에 교미 허용 반응을 검사한 결과는 Table 37와 같다.

Table 37. Standing response according of estrus times

Type of response	Before 2 days AI	1st AI	2nd AI
Positiveness	18/25(72.0%)	22/25(88.0%)	19/25(76.0%)
Passiveness	6/25(24.0%)	3/25(12.0%)	5/25(20.0%)
Negativeness	1/25(4.0%)		1/25(4.0%)

수정일인 호르몬 양성반응을 보이는 시점에 적극적인 교미 허용두수는 22두로 88.0%를 보였고 소극적인 교미 반응을 보인 개체는 3두로서 수정 2일전이나 수정 2일 후보다 훨씬 적극적인 양상을 보임을 알 수 있었다.

교미반응에 따른 인공수정 수태율과 산자수의 결과는 Table 38과 같다.

Table 38. Effect of standing response on pregnancy and maen pups following intrauterine insemination

Type of response		Before 2 days AI	1st AI	2nu AI
Positiveness	Pregnancy	11/18(61.1%)	13/22(59.1%)	11/19(57.9%)
	No. of pups	53(4.81)	61두(4.7)	52두(4.72)
Passiveness	Pregnancy	4/7(57.1%)	2/3(66.7%)	4/6(66.7%)
	No. of pups	17(4.25)	9두(4.5)	18두(4.5)

교미 적극적인 반응을 보이는 개체는 수정 2일전 적극적일 때 수태율이 다소 높은 경향을 보였으며, 소극적인 반응을 보이는 개체는 수정일과 수정 2일후 소극적일 때 수태율이 높은 것으로 나타났다. 산자수의 경우도 유의적인 차이는 없지만 같은 경향을 보였다. 따라서 인공수정이 수정 2일전에는 적극적인 교미반응을 보이고, 수정일 보터는 다소 소극적일 때 수태율이 높은 것으로 나타나 이 또한 인공수정 적기 판정의 주요 판단 기준이 될 수 있다고 사려 되었다.

바) 인공수정 적기 판정 기술의 종합

앞서 검토한 적기 판정기술을 고려하여 적기 판정에 긍정적인 결과를 도출시킨 기술들은 발정관찰에 의한 발정 확인과 초음파검사에 의한 배란유무 확인, 호르몬 양성 반응이 있고, 교미반응 상태 등을 들 수 있다. 이를 고려한 종합적인 검토결과는 다음과 같다.

호르몬 양성반응을 보이는 시점인 발정일 에서 11일째 인공수정은 주요하게 작용하므로 이는 제외하고 나머지 발정확인, 배란유무, 교미반응에 대하여 검토하였다. 발정이 확인되고 수정이 비배란, 또는 배란이 시작되고 수정간 적극적인 교미반응을 보이

는 개체에서 좋은 결과가 얻어졌다. 따라서 진도건의 이상적인 인공수정 적기 판정기
술과 적용은 우선 발정을 확인하고 수정란 교미반응이 적극성을 보이는 개체로 호르
몬검사를 하여 progesterone 수준이 2.0 ng/ml 이상의 양성 반응을 보이는 시점인
발정일로부터 11일경에 초음파검사로 배란 직전이거나 배란이 개시되는 시점에 인공
수정 하는 것이 가장 이상적인 적기일 것으로 판단되었다.

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 년도별 연구 목표

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2000-2001)	○ 동결정액을 이용한 인공수정기술의 개발(순천대학교)	○ 자궁내 인공수정기구의 개발 - 암컷생식기관의 구조조사 - 자연교미와 유사한 조건으로 인공수정기구 제작 - Balloon sheath, vaginal endoscope 및 injection catheter의 구조결정 - 시제품제작 및 제작의뢰
	○ 동결정액희석액 및 제조기술 개발(젯소개량부)	○ 진도개 동결정액제조를 위한 기초기술정립 - 진도개 정액 성상조사 - 진도개 동결정액의 제조방법 정립 - 동결정액 완충액의 조성표 개발 - 진도개에 적합한 동결보존액 개발
	○ 진도개관리 및 농가인공수정 (진도개보육관리소)	○ 시험용 진도개의 선발관리 - 외모심사에 의한 종건 선발 - 종건의 정액채취와 번식력 조사 - 번식기 질병 유/무의 조사와 방역관리 - 종빈건번식력 및 개체변이조사(유전, 품성, 체형)
2차년도 (2001-2002)	○ 동결정액을 이용한 인공수정기술의 개발(순천대학교)	○ 자궁내 인공수정기구 시제품의 개선보완조치 - 시제품 이용한 인공수정기술로 개선 및 보완함 ○ 동결정액을 이용한 인공수정기술의 정립 - 자궁내 인공수정기구에 의한 인공수정기법 정립
	○ 동결정액희석액 및 제조기술 개발(젯소개량부)	○ 진도개 동결정액제조 및 적정충진 정자수 정립 - 동결/융해 후 정자두부의 손상여부 조사 - 정자의 생존율과 전진운동을 조사 - CASA에 의한 생존율조사하여 객관적 자료취합 ○ 진도개의 개체간 동결능력의 조사 - 개체간 정액성상 및 동결보존능력 비교조사

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
2차년도 (2001-2002)	○진도개관리 및 농가인공수정 (진도개보육관리소)	○인공수정적기 판단기준 정립 및 시범적 농가인공수정 실시(총 50두) -질상피세포검사에 의한 인공수정 적기판단 -초음파 조사 및 교미허용 반응 관찰 -호르몬측정에 의한 인공수정 적기판단 -질 상피세포 검사·초음파·호르몬 측정에 의한 최상의 인공수정적기 판별
3차년도 (2002-2003)	○동결정액을 이용한 인공수정기술의 개발(순천대학교)	○자궁내 인공수정기구와 인공수정기술의 보급 -보완된 인공수정기구의 저변확대를 위한 보급 -인공수정기술의 완벽한 정립 -인공수정기술의 보급체계 구축 -자궁내 인공수정기구의 국제특허 출원 -자궁내 인공수정기구 대량생산과 보급체계구축
	○동결정액희석액 및 제조기술 개발(젓소개량부)	○ 우수한 진도개의 정자은행 구축 -우수진도개의 유전자원 보존과 정자은행 구축 -근친번식을 예방하기 위한 우수 종건의 동결정액 보급 -Interface실시로 최상의 종건을 생산
	○ 진도개관리 및 농가인공수정 (진도개보육관리소)	○자궁내 인공수정기술을 이용한 체계적인 번식육종 실시 -인공수정에 의한 우수종건의 계획적인 선발과 육종체계 구축 -인공수정에 의한 우수 진도개의 대량번식체계 구축 -우수혈통 진도개의 정자의 영구보관 체계확립

2. 평가 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척도(점수)	달성도(%)
1차년도(2000년)	○ 동결정액 회석액의 개발 ○ 동결정액 제조방법 정립 ○ 자궁내 인공수정기구 개발	33 33 33	100 100 100
2차년도(2001년)	○ 인공수정적기 판단기법 정립 ○ 자궁내 인공수정시 적정 정자농도조사 ○ 자궁내 인공수정기술정립	33 33 33	100 100 100
3차년도(2002년)	○ 계획적 번식육종체계 구축 ○ 대량생산체계 구축 ○ 정자은행 구축 ○ 전문번식장 구축	25 25 25 25	100 100 100 100
최종평가	○ 동결정액 제조기법의 정립 ○ 동결정액 회석액의 조성 ○ 인공수정기구의 개발 ○ 자궁내 인공수정기술의 정립	25 25 25 25	100 100 100 100

3. 관련분야에의 기여도

진도개 동결정액제조와 자궁내 인공수정기술 개발을 성공함으로써 관련분야에의 기여도는 매우 높다고 하겠다.

첫째, 우수한 진도개의 유전자원을 반영구적으로 보존이 가능함으로써 계획적인 번식 육종이 가능하다. 이는 진도군뿐만이 아니라 국내의 타지역에서 존재하고 있는 모든

진도개의 유전자원에도 똑 같은 혜택이 주어질 수 있다.

둘째로, 동결정액의 보존이 가능해 짐으로써 우수한 유전자원의 semen baking이 가능해 졌다.

셋째, 자궁내 인공수정기구를 개발하여 자궁내 인공수정이 가능해 졌다. 지금까지 인공수정이 불가능하여 자연교미 또는 질내주입에 의한 인공수정 등의 방법을 이용하였으나, 자궁내 인공수정기구를 이용한 자궁내 인공수정이 가능해져 효율적인 번식이 가능할 뿐만 아니라 시간적, 공간적 제약을 극복하면서 원하는 종건과의 수정이 가능해 졌다.

넷째, 자궁내 인공수정기술을 이용함으로써 번식기 질병감염을 줄일 수 있다.

다섯째로, 가축인공수정사 및 수의사들의 새로운 사업분야를 개척하였다. 개의 자궁내 인공수정기술을 시술하는 인공수정사 및 수의사들이 늘어가면서 개 사육농가들도 효율적인 번식을 위하여 자궁내 인공수정을 선호하고 있다.

여섯째, 애완견 등으로 본 기술을 접목 가능할 것으로 판단된다. 반려동물로서 애완견 의사육인구가 급격히 증가하면서 번식만을 위한 종건수입이 급증하고 있다. 그러나 동결정액을 이용한 자궁내 인공수정기술을 이용한다면 고가의 종건수입 대신 동결정액을 수입하여 이용할 수 있을 것이다. 궁극적으로는 외화낭비를 막는 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다.

일곱째, 체계적인 번식체계를 이용한 전문번식장을 운영하는 농가를 육성할 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

* 추가연구의 필요성

- 정액의 이용효율을 극대화하기 위하여 동결정액의 주입농도에 따른 수태율과 분만율을 조사한 결과 적은 반복수의 실험결과로 이제까지 알려진 5천만 정도의 농도가 효율적인 것으로 판단되었다. 그러나, 2천5백만과 5천만의 중간정도인 3천7백5십만의 농도로 인공수정실험을 수행하여 유사한 결과를 얻을 수 있다면 정액의 이용효율을 높일 수 있을 것으로 판단된다. 왜냐하면, 진도개의 정액채취 시 약 3-5억 정도의 정자농도를 보여 1회 채취 후 3-5두 밖에 수정을 시킬 수 없어 정액채취와 제조과정에 비하여 그 효율적인 면에서 매우 비효율적이라고 판단된다. 그러나 1회 주입시 정액량을 줄일 수 있다면 정액의 이용효율을 증가시키는 결과이기때문에 동결정액을 이용한 자궁내 인공수정기술의 접목을 위해서는 반드시 이러한 문제를 극복해야 할 것으로 판단된다.

* 타연구에의 응용

- 애완견 또는 특수견 등의 고가의 개들에게 이들의 기술을 접목하는 연구가 요구된다고 하겠다. 애완견산업의 급성장으로 고급종견을 이용한 인공수정의 수요가 증가하는 추세라 진도개 동결정액제조와 자궁내 인공수정기술을 애완견 및 특수견 분야로의 접근을 위한 새로운 연구와 접근이 요구된다.

- 한국 고유의 개과동물인 여우 등의 특수동물연구에 응용이 가능할 것으로 판단된다. 멸종위기에 처한 토종여우의 유전자원을 보존하는 차원에서 정자의 보존, 즉 semen baking은 적극적으로 검토해 볼만 하다고 판단된다. 또한 이러한 기술을 토대로 번식능력이 낮은 이들의 번식력 재고에 응용될 수 있을 것이다.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

o 애완견 동결정자은행 및 공급회사 수개 설립되어 상업화를 실시 중임

Company	Main approach to canine frozen semen
International Canine Semen Bank(ICSB)	canine AI & frozen semen
Canadian Kennel Club	canine frozen semen
American Dog Breeders Association	canine AI & frozen semen
Interglobe Genetics	canine frozen semen banking

제 7장 참고문헌

- Boucher, J. H., Foote, R. H. and Kirk, R. W. 1958. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality libido and depletion of sperm reserves. *Cornell Vet.* 48:67-86.
- Concannon PW and Battiata M. Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy X.W.B. Saunders, Philadelphia* 1989; 1253.
- Concannon PW and Battiata M. Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy X.W.B. Saunders, Philadelphia* 1989; 39(Suppl): 289-292
- Dobrinsky, I., Lulai, C., Barth, A. D. and Post, K. 1993. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post thaw viability of dog semen. *J. Reprod. Fertil.* 47(Suppl.):291-296.
- Farstad W and Anderson Berg K. Factors influencing in success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J Reprod Fertil* 1989; 39(Suppl): 289-292.
- Farstad W, Fougner JA and Torres CG. The effect of sperm number on fertility in blue fox vixens (*Alopex lagopus*) artificially inseminated with frozen silver fox (*Vulpes vulpes*) semen. *Theriogenology* 1992; 37: 699-711.
- Farstad W. The correlation between a cyclus coefficient based on cytological indices in the vaginal smear and circulating progesterone in oestrous bitches. *Zuchthygiene* 1985; 19: 211-217.
- Fougner JA, Aamdal J and Anderson K. Intrauterine insemination with frozen semen in the blue fox. *Nord Vet-Med* 1973; 25: 144-149.
- Gunzel, A. R. 1986. Sperm collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. *Tierarztl Prax.* 14(2):275-282.
- Harrop, A. E. 1954. A new type of canine artificial vagina. *Br. Vet. J.* 110: 194-196.
- Harrop, A. E. 1962. Artificial insemination in the dog. In the semen of animals and

- artificial insemination. J.P. Maule, ed. Commonwealth Agri. Bureaux, Farnham Royal, England. p. 186-189.
- Ivanova-Kicheva MG, Subev MS, Bobadov ND, Dacheva DP and Rouseva LA. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology* 1995; 44: 563-569.
- Kong IK, Cho SG, Im YT and Lee SI. Production of pups following artificial insemination by intrauterine inseminator. *Korean J Emb Trans* 1999; 14(2: Suppl.): 43(P-3).
- Linde-Forsberg C, Strom Holst B and Govette G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology* 1999; 52:11-23.
- Molinia FC, Evans G and Maxwell WMC. 1994. In vitro development of zwitterions buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.*, 34:491-500.
- Rota A, Iguer-Ouada M, Verstegen J and Linde-Forsberg C. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without equex STM paste. *Theriogenology* 1999; 51:1045-1058.
- Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C and Rodriguez-Martinez H. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* 1997; 47: 1093-1101.
- Rota, A., Strom, B. and Linde-Forsberg, C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44:885-900.
- Roychoudhury, P. N. and Dubay M. L. 1974. *Zootecnica Veterinaria*, N. 5-6: 117-121.
- Seager, S. W. J. and Fleccher, W. S. 1972. Collection, storage and insemination of canine semen. *Lab. Anim. Sci.* 22:177-182.
- Silva LDM and Verstegen JP. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 1995; 44; 571-579.

- Strom B, Rota A and Linde-Forsberg C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 1997; 48: 247-256.
- Wilson MS. Non-Surgical intrauterine insemination in bitches using frozen semen. *J Reprod Fertil* 1993; 47(Suppl): 307-311
- Woelders H, Matthijs A and Engel B. Effect of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*, 35:93-105.
- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M and Tekeli T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54:579-585.
- Yildiz, C. Kaya, A, Akoy, M. and Tekeli, T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54:579-585.
- '99. 10월 수출·입 동물 및 축산물 검역·검사실적. *수의과학검역년보*. 1999. pp 66.
- 공일근, 조성균, 임용택, 이상인, 위성하. 1999. 개 자궁내 인공수정기에 의한 인공수정 후 산자생산. *한국임상수의학회지*. 16(2):375-380.
- 공일근, 조성균. 2001. Royal Jelly 첨가가 동결융해후 개 정자의 활력도 및 생존성에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*. 16:53-60.
- 김병진, 김용준. 1995. Methanol 이용 동결후 액체질소내 보존된 견 정액의 인공수정에 관한 연구. *한국임상수의학회지*. 12:207-214.
- 김용섭, 김상근, 유상식, 정진호. 1999. 소형 개 정액의 단기보존과 동결보존후의 생존성에 관한 연구. *한국가축번식학회지*. 23:127-132.
- 김용준, 박영재, 김병진, 유일정. 1994. 개에서 동결정액을 이용한 인공수정. Methanol을 이용한 간이 동결방법. *대한수의학회지*. 34:851-855.
- 박병권, 박창식, 이성호, 박영석. 1997. 한국 진도견 정액의 성상 및 보존성에 관한 연구. *한국가축번식학회지*. 21:405-409.
- 신남식, 문유식, 정동희, 김용준. 개에서 내시경을 이용한 동결정액의 인공수정. *한국임상수의학회지*. 1997; 14: 297-300.

정정란, 유재구, 양성열, 여현진, 박종식, 예은하, 노규진, 최상용. 2001a. 개 정자의 보존방법에 따른 침체 및 생존성의 변화. I. 저온보존에 따른 효과. 한국수정란이식학회지. 16:35-40.

정정란, 유재구, 양성열, 여현진, 박종식, 예은하, 노규진, 최상용. 2001b. 개 정자의 보존방법에 따른 침체 및 생존성의 변화. II. 동결보존에 따른 효과. 한국수정란이식학회지. 16:133-138.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.